

Institut für Physiologie und Pathophysiologie  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität  
Marburg

## **DISSERTATION**

# **Die Rolle von SCAMP Proteinen beim intrazellulären Transport des Kaliumkanals TASK-1**



**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von**

Stefan Kling  
aus Hildburghausen  
Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
18.09.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut

1. Korreferent: Prof. Dr. Carsten Culmsee

Jahr der Promotion: 2015

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	8
Zusammenfassung .....	I
Summary .....	III
1. Einleitung .....	9
1.1. Kaliumkanäle .....	9
1.2. Familie der $K_{2P}$ -Kanäle .....	10
1.3. TASK-Kanäle .....	12
1.4. Der TASK-1 Kanal .....	13
1.4.1. Interaktionspartner von TASK-1 .....	14
1.5. SCAMP -Familie .....	16
1.5.1. Interaktionspartner der Secretory carrier membrane Proteine.....	18
1.6. Intrazellulärer Transport.....	21
1.7. Endozytose .....	23
1.7.1. Clathrinabhängige Endozytose.....	24
1.8. Zielsetzung .....	26
2. Materialien .....	27
2.1. Chemikalien und Reagenzien .....	27
2.2. Geräte.....	29
2.3. Verwendete Bakterienstämme.....	30
2.4. Hefestämme .....	31
2.5. Verwendete eukaryotische Zellen.....	31
2.6. Oligonukleotide .....	32
2.7. Kits.....	34
2.8. Plasmide .....	34
2.9. Antikörper .....	39
3. Methoden .....	40
3.1. Molekularbiologische Methoden .....	40
3.1.1. Medien, Puffer und Lösungen .....	40
3.2. Hefe-Zwei-Hybrid-Split-Ubiquitin-System .....	47
3.3. Kultivierung von E.coli .....	50
3.3.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	50
3.3.2. Herstellung elektrisch kompetenter Zellen.....	51
3.3.3. Chemische Transformation von Bakterien.....	51
3.3.4. Elektrische Transformation von Bakterien .....	52
3.3.5. Plasmidisolierung .....	53
3.3.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	54

3.3.7.	PCR Purification- Kits .....	56
3.3.8.	DNS-Restriktion .....	56
3.3.9.	DNS-Ligation .....	57
3.3.10.	DNS-Gelelektrophorese .....	57
3.3.11.	DNS-Sequenzierung .....	58
3.3.12.	cRNS -Synthese.....	58
3.4.	Methoden der Elektrophysiologie.....	59
3.4.1.	Injektion von cRNS in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	59
3.4.2.	Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Messungen .....	60
3.5.	Oberflächenassay .....	61
3.6.	Zellkultur .....	62
3.7.	Methode der Fluoreszenzmikroskopie .....	64
3.8.	Antikörper Aufnahme Assay .....	64
3.9.	Proteinbiochemie .....	66
3.9.1.	Proteinexpression in <i>E.coli</i> BL21 .....	66
3.9.2.	Proteinexpression in HeLa .....	67
3.9.3.	Pull-down-Assay.....	67
3.9.4.	GST-Pull down .....	68
3.9.5.	His- Pull down .....	69
3.9.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	69
3.9.7.	Westernblotting .....	71
3.10.	Statistische Auswertung .....	72
4.	Ergebnisse .....	73
4.1.	Bestimmung der Proteininteraktion im Hefe-Zwei-Hybrid System .....	73
4.2.	Funktionelle Interaktionsstudien zwischen TASK-1 und SCAMPs.....	74
4.2.1.	Interaktion von SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 mit TASK-1.....	74
4.2.2.	Untersuchung der Spezifität der SCAMP - Interaktion mit TASK-1 .....	86
4.2.3.	Charakterisierung der Interaktion der TASK-1 Bindungsstelle .....	89
4.3.	Biochemische Untersuchung der Proteininteraktionen .....	92
4.3.1.	GST- Pull Down Assay .....	92
4.3.2.	His- Pull Down Assay .....	94
4.4.	Fluoreszenzmikroskopie .....	98
4.5.	Quantifizierung der Endozytoserate.....	110
5.	Diskussion.....	115
6.	Anhang.....	129



## Zusammenfassung

TASK-1 (TWIK-related **Acid-Sensitive K<sup>+</sup> channel 1**) ist ein säuresensitiver K<sup>+</sup> Kanal und gehört zu der Familie der K<sub>2P</sub>-Kanäle (Kaliumkanäle mit zwei Porendomänen). TASK-1 wird in Neuronen, Herzmuskelzellen, glatten Muskelzellen und zahlreichen anderen Zellen exprimiert. In diesen Zellen besitzt TASK-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation ihrer Erregbarkeit. Sowohl die transkriptionelle als auch die posttranslationale Regulation von TASK-1 bestimmen die Anzahl der Kanäle auf der Zellmembran und damit direkt den durch TASK-1 vermittelten Strom. Die Regulation der Oberflächenexpression von TASK-1 hat demnach direkten Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften einer Zelle. Die Menge eines Membranproteins an der Zelloberfläche wird im Wesentlichen von zwei Faktoren bestimmt: (1) von dem Vorwärtstransport und (2) von der Endozytose der Zellmembran. Der Vorwärtstransport („forward trafficking“) bezeichnet den Transport von Transmembranproteinen vom **rauen endoplasmatischen Retikulum** (rER) zum Golgi-Komplex und weiter zur Zellmembran. Die Aufnahme von Proteinen aus der Zellmembran ins Zellinnere wird Endozytose genannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Split-Ubiquitin basierter Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit einer cDNS-Bibliothek aus dem Gehirn durchgeführt, wobei TASK-1 als „Köder“-Protein verwendet wurde. Wir identifizierten Secretory Carrier Membrane Protein 5 (SCAMP5) als neuen Interaktionspartner („Beute“) für TASK-1. Dieses Protein, SCAMP5, gehört zur Familie der „Secretory Carrier Membrane Proteins“. Die strukturellen Gemeinsamkeiten der Proteine dieser Familie sind die vier **Transmembran-Domänen** (TMD), ein E-Peptid und eine Prolin reiche Sequenz im N-Terminus. Die Mitglieder SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP3 besitzen in ihrem N-Terminus drei NPF-Domänen. Die NPF-Domänen bestehen aus den Aminosäuren Asparagin-Prolin-Phenylalanin und sind in der Lage an EH-Domänen (Epsin Homologe Domänen) zu binden, während SCAMP4 und SCAMP5 nur einen kurzen N-Terminus besitzen, der keine NPF-Domänen enthält. SCAMP5 wird vorwiegend im neuronalen Gewebe exprimiert, im Gegensatz dazu zeichnen sich die anderen Mitglieder der Familie durch eine ubiquitäre Expression aus.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen gezeigt, dass bei Koexpression von TASK-1 mit SCAMP5, SCAMP1 oder SCAMP2 der durch TASK-1 Kanäle fließende Strom deutlich reduziert wird. Die Oberflächenexpression von TASK-1 wurde mittels eines auf der extrazellulären Seite zugänglichen Hämagglutinin-Motivs (HA-Tag) durch einen luminometrischen Oberflächenassay gemessen. Es zeigte sich, dass bei einer Koexpression der SCAMPs mit TASK-1 die Anzahl der Kanäle auf der Zellmembran deutlich reduziert wird. Die Entfernung der NPF-Domänen im N-Terminus von SCAMP1 und SCAMP2 führen zu einer deutlichen Erhöhung des TASK-1 induzierten Stroms sowie zu einer erhöhten Oberflächenexpression der Kanäle im Vergleich zur Koexpression mit den Wildtypen von SCAMP1 oder SCAMP2. Die Clathrin-vermittelte Endozytose wurde gezielt inhibiert um zu zeigen, dass die Verringerung der Oberflächenexpression auf eine erhöhte Endozytoserate zurückzuführen ist. Sowohl der chemische Blocker Dynasore als auch die Koexpression des dominant-negativen Adapterproteins AP180C konnten den Effekt der SCAMP Proteine auf den TASK-1 induzierten Strom in Oozyten aufheben.

Interessanterweise konnte mit der Hefe-Zwei-Hybrid Methode eine direkte Interaktion ausschließlich zwischen TASK-1 und SCAMP5, aber nicht zwischen TASK-1 und SCAMP1 und auch nicht zwischen TASK-1 und SCAMP2 nachgewiesen werden. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich, dass eine Kolokalisation an der Zellmembran nur zwischen TASK-1 und SCAMP5 stattfand. Die direkte Quantifizierung der Endozytoserate erfolgte mit dem Antikörper-Aufnahme-Assay. Nach 30 min wurde eine signifikante Internalisierung von TASK-1 bei Kotransfektion mit SCAMP5 beobachtet, jedoch nicht nach einer Kotransfektion mit SCAMP1 oder SCAMP2. Proteinbiochemische Analysen (Histidin Pull-Down Assay) zeigten, dass SCAMP5 sowohl Homomere (wahrscheinlich Homodimere) als auch Heteromere mit SCAMP1 oder SCAMP2 bilden kann. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass SCAMP1 und SCAMP2 nur indirekt über das Adapterprotein SCAMP5 einen Effekt auf TASK-1 ausüben.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Secretory Carrier Membrane Proteine eine entscheidende Rolle bei der Clathrinvermittelten Endozytose von TASK-1 spielen.

## Summary

TASK-1 (TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1) is an acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. It belongs to the family of two-pore domain K<sup>+</sup> (K<sub>2P</sub>) channels, which are involved in array of physiological and pathophysiological processes. TASK-1 is widely distributed, being particularly abundant in the pancreas and placenta, but it is also found in the brain, heart, lung and kidney. The intracellular traffic of TASK-1 has been studied in some detail but relatively little is known about the endocytosis of TASK-1. The channel expression at the cell surface is regulated by both forward trafficking and endocytosis mechanisms. We have tried here to elucidate the functional relevance of the interaction between the potassium channel and the SCAMPs.

We performed a split-ubiquitin based yeast two-hybrid screen with a brain cDNA library using TASK-1 as bait and identified Secretory Carrier Membrane Protein 5 (SCAMP5) as an interaction partner. Structurally, all SCAMPs contain a highly conserved four hydrophobic transmembrane domains (TMDs) with three inter-TMD-flanking sequences. The hydrophilic loop between transmembrane domain 2 and 3, known as the E-peptide, shows the highest degree of sequence conservation. The cytoplasmic N- and C-termini, flanking the SCAMP domain, have variable length and highest diversity. Of all SCAMP isoforms, SCAMP4 and SCAMP5 are the only isoforms that lack the N-terminal NPF-repeat domains. SCAMP5 is mainly expressed in neural tissues, whereas the other members of SCAMP family are ubiquitously expressed. Expression of TASK-1 in *Xenopus* oocytes gave rise to an acid-sensitive outward current. The amplitude of this current was reduced to about 50 % when TASK-1 was co-expressed with SCAMP5. A similar reduction of current amplitude was observed after co-expression of the channel with SCAMP1 and SCAMP2. Deletion of the (NPF) domains in the amino terminus of SCAMP1 and 2 proteins abolished the effects of SCAMP1 and SCAMP2 on the endocytosis of TASK-1. When we co-expressed the C-terminal part of the adaptor protein AP180 (AP180C) the effect of SCAMPs on the amplitude of TASK-1 currents was abolished. A similar effect was also observed by Dynasore, a specific blocker for dynamin dependant endocytosis. An antibody uptake assay performed in COS7 cells (where only SCAMP1 and 2 are moderately expressed but SCAMP5 is not expressed) showed a substantially reduced surface expression of TASK-1 after co-expression of SCAMP5.

Fluorescence microscopy showed a clear co-localisation of TASK-1 and SCAMP5 at the cell surface. Additional biochemical interaction studies like His-tag pull-down assay showed that SCAMP5 can form homo and heteromers with SCAMP1 and SCAMP2. Our data suggests that SCAMP1 and SCAMP2 can exert their effect on TASK-1 via SCAMP5, where SCAMP5 plays a role as an adaptor protein.

Taken together, these results strongly indicate that the secretory carrier membrane proteins play a crucial role in clathrin mediated endocytosis of TASK-1 via NPF domains.

# 1. Einleitung

## 1.1. Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind eine vielseitige Familie von Membranproteinen in Zellen. Sie bilden, bezogen auf Funktion und Struktur, die größte Familie der Ionenkanäle. Die Selektivität für  $K^+$ -Ionen wird durch einen Selektivitätsfilter in der Porenregion gewährleistet. Der Durchtritt von Kaliumionen durch die Pore erfolgt mit einer Rate von  $10^6$  bis  $10^8$  Ionen/sec entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Die Kanäle spielen eine entscheidende Rolle bei zellulären Prozessen, wie zum Beispiel bei der Einstellung des Membranpotentials, der neuronalen Integration und der neuronalen Erregbarkeit sowie bei der Freisetzung von Neurotransmittern. Ebenso sind die hormonelle Sekretion (z.B. die Insulinsekretion), der Elektrolyt Transport, die Kontraktion der glatten Muskulatur, die Zellvolumenregulation sowie die Einstellung der Herzfrequenz Prozesse, an denen Kaliumkanäle beteiligt sind. Von besonderem medizinischem Interesse sind Kaliumkanäle, zumal sie bei Erkrankungen des Herzens, der Niere, der Bauchspeicheldrüse und des zentralen Nervensystems eine Rolle spielen. Für Kaliumkanal-Untereinheiten wurden bisher in Säugetieren 67 Gene identifiziert. Die Kanäle werden auf Basis der Aminosäuresequenz ihrer Untereinheiten in mehrere Strukturklassen unterteilt.

Die erste Gruppe umfasst 40 verschiedene Gene und ist gekennzeichnet durch 6 oder 7 Transmembransegmente, welche eine einzelne Pore bilden. Zu diesen spannungsabhängigen und  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ - Kanälen (Shaker-like) gehören die Shab, Shaw, Shal, Modifier und die hEther-a-go-go- verwandten  $K^+$ - Kanäle (hERG). Dazu zählen auch die KCNQ- Kanäle, die durch Depolarisation aktiviert werden. Das Tripeptidsequenz - Motiv G(Y/F)G in der porenassoziierten Peptidschleife (Pore-Loop), die zwischen der Transmembrandomäne 5 und Transmembrandomäne 6 liegt, bildet den Kaliumselektivitätsfilter. Sie sind an einer Vielzahl von zellulären Funktionen, wie Elektrolyt- und Substrattransport, Zellvolumenregulation, Zellmigration, Wundheilung, Proliferation, Apoptose, Karzinogenese und Ermittlung des Sauerstoffpartialdrucks beteiligt.

Die zweite große Gruppe sind die Einwärtsgleichrichter  $K^+$ -Kanäle („inward rectifier“  $K^+$ -Kanäle [Kir]). Diese Kanäle besitzen 2 Transmembrandomänen und eine Porenschleife. Es werden vier Untereinheiten von Kir benötigt, um einen funktionstüchtigen Kanal zu bilden. Mutationen in diesen Kanälen führen zu verschiedenen Krankheiten. Zum Beispiel wird das Andersen-Syndrom durch eine Mutation in Kir2.1 verursacht. Die dritte Gruppe sind die Kalium 2 Poren-Kanäle, auf welche im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird (Duprat *et al.* 1997, Shieh *et al.* 2000, Heitzmann und Warth R. 2007).

## 1.2. Familie der $K_{2P}$ -Kanäle

Im Zeitraum von 1996 bis 2003 wurde eine neue Gruppe von Kalium-Kanälen beschrieben, welche ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert werden. Die Mitglieder dieser Familie besitzen im Vergleich zu anderen  $K^+$ -Kanälen eine einzigartige Membran-Topologie. Die Kanaluntereinheiten bestehen aus zwei Porendomänen und vier Transmembrandomänen (Abb.1.2.1). Ein funktionstüchtiger  $K_{2P}$ -Kanal besteht aus zwei Untereinheiten, die eine  $K^+$ -selektive Pore bilden. Der  $K^+$ -selektive Filter besteht aus der Aminosäuresequenz T(I/T)G(Y/F)G der extrazellulären Schleife (P1) zwischen den Porendomänen 1 und 2. Die selektive Wirkung wird durch die Aminosäuresequenz T(I/V)G(F/L)G der extrazellulären Schleife (P2) zwischen den Porendomänen 3 und 4 vervollständigt (Zhang *et al.* 2009).

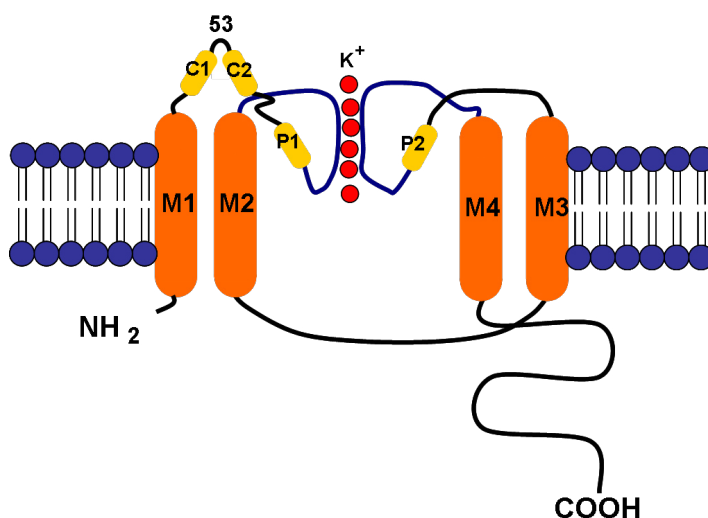


Abbildung 1.2.1: Schematische Darstellung eines  $K_{2P}$  Kanals  
Die Kanäle setzen sich aus vier Transmembrandomänen (M1- M4), den zwei Kappen Helices (C1 und C2) über den Transmembrandomänen 1 und 2 sowie zwei Porenhelices (P1 und P2) zusammen (Kilisch *et al.* 2015)

Im menschlichen Genom wurden bisher 15 Mitglieder der  $K_{2P}$ -Kanäle identifiziert. Von diesen 15 Mitgliedern sind 12 funktionell in Expressionssystemen *in vitro* charakterisiert worden und können weiter je nach Verwandtschaftsgrad in 6 Untergruppen eingeteilt werden (Abb. 1.2.2).

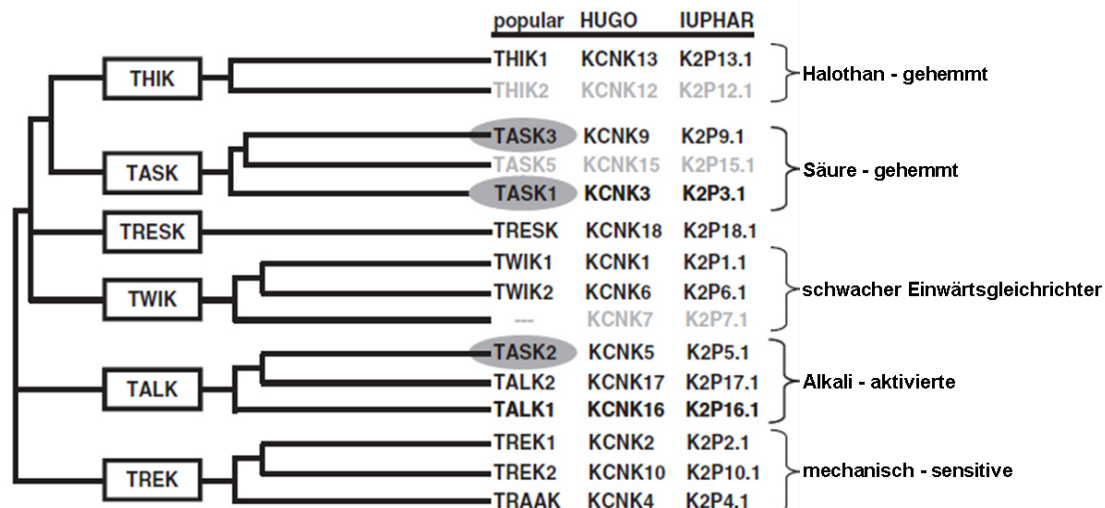


Abbildung 1.2.2: Phylogenetischer Stammbaum der 6 Unterfamilien der  $K_{2P}$ -Kanäle. Nichtfunktionale Mitglieder dieser Familie sind grau dargestellt. TASK = TWIK related acid-sensitive  $K^+$ -Kanäle sind von besonderem Interesse und daher hervorgehoben. Angegeben sind alle in Gebrauch befindlichen Nomenklaturen für  $K_{2P}$ -Kanäle (Bittner *et al.* 2010).

$K_{2P}$ -Kanäle spielen eine entscheidende Rolle bei der Einstellung und Modulation des Ruhemembranpotentials. In Folge der Aktivität der  $K_{2P}$ -Kanäle, kommt es zum Ausstrom von  $K^+$ -Ionen. Das Resultat des  $K^+$ -Ionenausstroms ist die Hyperpolarisation der Zellmembran. Sind die Kanäle geschlossen, also inaktiv, oder werden sie blockiert, wird die Erregungsbildung und Reizweiterleitung erleichtert. Diese Kanäle erzeugen somit eine Hintergrund  $K^+$ -Leitfähigkeit bei negativem Membranpotential und die Regulation der Kanäle erfolgt meist zeit- und spannungsunabhängig. Aus diesem Grund wurden sie zunächst als Hintergrundkanäle oder als Leck-Kanäle („leak channels“) betrachtet. Es ist bekannt, dass Kanäle mit vielen Proteinen interagieren. Dies trifft auch auf die  $K_{2P}$ -Kanäle zu (siehe Tabelle 1). Die  $K_{2P}$ -Kanäle unterliegen einer komplexen Steuerung durch ein breites Spektrum vom chemischen und physikalischen Reizen. Dazu zählen Modulationen durch den pH-Wert,  $O_2$ -Partialdruck, Membrandehnung, Temperatur, G-Proteine, Fettsäuren und Inhalationsanästhetika.

Tabelle 1: Interaktionspartner der K<sub>2P</sub>-Kanäle

In dieser Tabelle sind einige Interaktionspartner mit ihrer Funktion bei Bindung an verschiedene K<sub>2P</sub>-Kanäle aufgeführt (Mathie *et al.* 2010).

Bindungspartner	Kanal	mögliche Bedeutung
14-3-3	TASK-1/TASK-3	Erhöht die Oberflächenexpression des Kanals
14-3-3	TRESK	Calcineurin reguliert/vermittelte Aktivierung des Kanals
AKAP150	TREK1	Erhöht den Strom durch die Bindung an regulatorische Domäne
ARF6 / EFA6	TWIK1	Verbessert die Kanalinternalisierung
COP1	TASK-1/TASK-3	Kanal wird im ER zurückgehalten
Mtap2	TREK1	Verbessert Oberflächenexpression und erhöhte Stromdichte
NOX4	TASK-1	Überträgt eine O <sub>2</sub> -Empfindlichkeit auf den Kanal
p11	TASK-1	Retentionsfaktor für TASK-1-Kanäle
SUMO	TWIK1	schnelle Internalisierung des Kanal
Vpu	TASK-1	Verhindert den Kalium-Strom

Wegen ihres selektiven und differentiellen Expressionsmusters sind K<sub>2P</sub>-Kanäle wichtig bei einer Vielzahl von zellphysiologischen und pathologischen Prozessen (Bittner *et al.* 2010). Zum Beispiel sind K<sub>2P</sub>-Kanäle ein wichtiges pharmazeutisches Ziel bei einer ganzen Reihe von Therapien bei Erkrankungen des Nervensystems, einschließlich der Neuroprotektion, neuropathischen Schmerzen, Depressionen, Anästhesie und Epilepsie (Mathie *et al.* 2010).

### 1.3. TASK-Kanäle

Zu den TWIK related acid sensitive K<sup>+</sup> channels (TASK), einer Unterfamilie der K<sub>2P</sub>-Kanäle, gehören die funktionellen Kanäle TASK-1, TASK-3 und der bisher als nicht-funktionell beschriebene TASK-5. TASK-Kanäle werden unter anderem durch extrazelluläre Ansäuerung, Hypoxie, Lokalanästhetika sowie G-Protein gekoppelte Rezeptoren gehemmt und können durch Inhalationsanästhetika aktiviert werden. TASK-2 und TASK-4 werden aufgrund ihrer alkalischen Aktivierbarkeit der TALK-Unterfamilie zugeordnet. TASK-1 und TASK-3 besitzen eine hohe Sequenzhomologie von 54%. Der K<sup>+</sup>-selektive Filter wird durch eine hoch konservierte Sequenz in der Porenregion 1 (P1) durch TTIGYG und in der Porenregion 2 (P2) durch TTT/IGFG erreicht. Das Histidin an Position 98, welches sich direkt an den Selektivitätsfilter der P1-Domäne anschließt, dient als Protonensensor (Abb. 1.3.1 und 1.4.1.1). Sinkt der extrazelluläre pH-Wert, wird der Histidinrest an Position 98 protoniert, was zur Schließung des Kanals führt. TASK-1



und TASK-3 werden im neuronalen Gewebe sowie im Herzen exprimiert und sind in der Lage Homo- und Heterodimere zu bilden. (Berg *et al.* 2004, Enyedi und Czirják 2010 und Bittner *et al.* 2010).

	P1	P2
TASK-1	AGSFYFAITVITTI <b>GYGHAAP</b>	AYYYCFITLTTT <b>GFGDYVA</b>
TASK-3	AGSFYFAITVITTI <b>GYGHAAP</b>	AYYYCFIGLTTT <b>GFGDYVA</b>
TASK-5	PGSFYFAITVITTI <b>GYGHAAP</b>	AYYYCFITLTTT <b>GFGDFVA</b>

Abbildung 1.3.1: Die Sequenz der zwei Porenschleifen (P1 und P2) von TASK-1, TASK3 und TASK5 (Zhang *et al.* 2009).

Es wird vermutet, dass die TASK-Kanäle an der Zellproliferation, an ischämischen und entzündlichen Gewebeschäden sowie an epileptischer Aktivität beteiligt sind. In der Tabelle 2 werden die pathophysiologischen Befunde und die Rolle von TASK-1, TASK-2 und TASK-3 zusammen gefasst (Bittner *et al.* 2010).

Tabelle 2: Einfluss von TASK- Kanälen bei pathophysiologischen Befunden (Bittner *et al.* 2010, Lijiang *et al.* 2013)

Topic	Kanal	experimentelle Befund
Onkologie	TASK-3	Überexpression in Tumorproben
	TASK-3	Anti-apoptotische Wirkung bei TASK-3 Expression
	TASK-3	Implikation in mitochondrialer Dysfunktion
pulmonaler arterieller Hypertonie	TASK-1	zunehmenden Anstieg des Gefäßwiderstandes und einen Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf
Ischämie	TASK-1	Erhöhte ischämische Schädigung in TASK-1-/- Mäusen
	TASK-1	Neuroprotektive Wirkung bei Kanal-Hemmung
Entzündung	TASK-1,3	spielen eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-Aktivierung
	TASK-2	nimmt Einfluss auf die T-Zell-Effektorfunktion
Epilepsie	TASK-1	Expression in Interneuronen dämpft neuronalen Tätigkeitsbereich
	TASK-1	Herunterregulation in Astrozyten hat eine anti-epileptische Wirkung

## 1.4. Der TASK-1 Kanal

1997 wurde TASK-1 von Fabrice Duprat als ein K<sup>+</sup>-Kanal beschrieben. Transkripte von TASK-1 wurden in verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel Pankreas, Plazenta, Prostata, Niere, Dünndarm, Uterus, Lunge, Herz und Gehirn gefunden (Duprat *et al.* 1997, Enyedi und Czirják 2010). Der native TASK-1 Strom wird durch Stimulation G<sub>q</sub>-gekoppelter Rezeptoren in verschiedenen Geweben gehemmt. Beispielsweise wird der Kanal in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde durch Angiotensin, in Motoneuronen des N. hypoglossus durch das Thyreotropin Releasing Hormon (*TRH*), Serotonin und durch metabotrope

Glutamat-Rezeptoren gehemmt. Im Gegensatz dazu aktivieren Inhalationsanästhetika, wie Halothan und Isofluran, den TASK-1 Kanal. Das führt zur Hyperpolarisierung der Neuronen, wodurch diese nicht mehr aktiviert werden können und eine Verkürzung des Aktionspotentials verursacht wird (Enyedi und Czirják 2010). Des Weiteren ist der Kanal wichtig für die Regulierung des pulmonalen Gefäßtonus (Lijiang *et al.* 2013). TASK-1, der aus 395 Aminosäuren besteht, nimmt Einfluss auf die Regulation des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Signalweges in Nebennierenzellen (Duprat *et al.* 1997, Nogueira *et al.* 2009). Jedoch ist der N-Terminus von TASK-1 nur fünf Aminosäuren groß, was darauf hindeutet, dass die meisten Interaktionspartner von TASK-1 entweder mit der Linker Region zwischen Transmembrandomäne 2 und 3 oder mit dem C-Terminus interagieren. Dazu zählen zum Beispiel p11 und 14-3-3 (Renigunta *et al.* 2006) (Abb. 1.4.1.1).

#### 1.4.1. Interaktionspartner von TASK-1

In den letzten Jahren wurden verschiedene Interaktionspartner von TASK-1 identifiziert, welche zu einem besseren Verständnis der Regulation von TASK-1 geführt haben. In Abbildung 1.4.1.1 sind TASK-1 und einige seiner wichtigsten Interaktionspartner schematisch dargestellt.

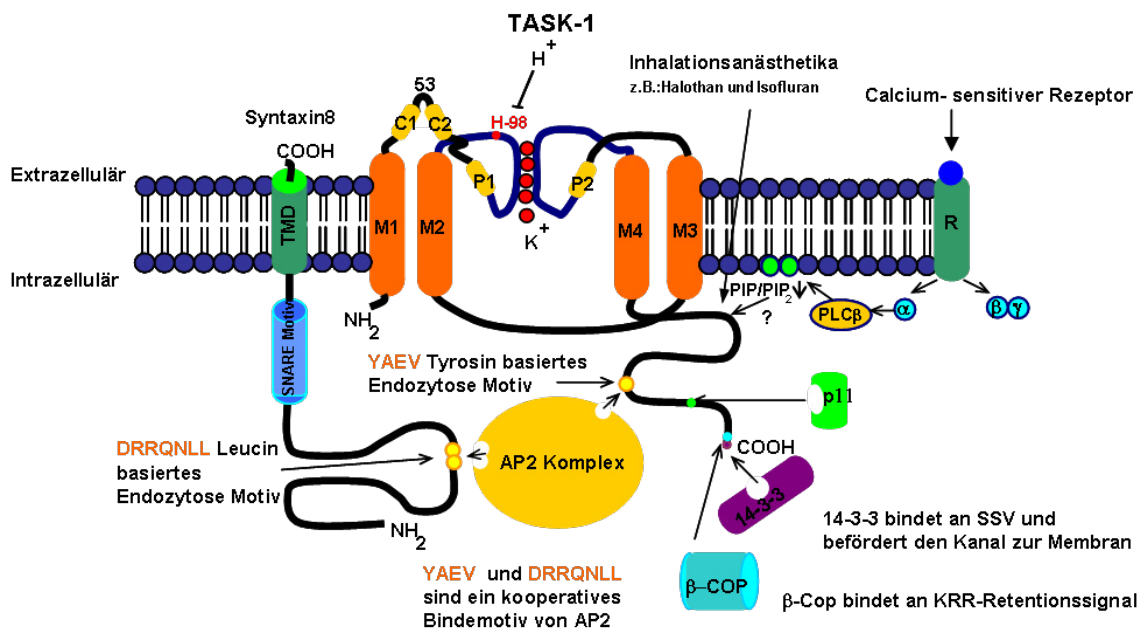


Abbildung 1.4.1.1: Regulation von TASK-1

Der Kanal TASK-1 wird durch Protonen und Chemikalien wie Anandamide gehemmt. Andererseits werden die Interaktionsproteine  $\beta$ -COP, p11, Syntaxin 8 und 14-3-3 sowie ihre Bindungsregion an TASK-1 dargestellt (Renigunta *et al.* 2006, Enyedi und Czirják 2010, Kilisch *et al.* 2015)

### **14-3-3**

Die Mitglieder der Proteinfamilie 14-3-3 werden nur in Eukaryonten exprimiert.

14-3-3 Proteine sind an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, wie z.B. dem Zellzyklus und der Apoptose. Sie dienen als Adapterproteine, Aktivatoren oder Repressoren (Fertl *et al.* 2002). Zum Beispiel erhöht eine Co-Injektion von 14-3-3 und TASK-1 cRNS in *Xenopus* Oozyten den Strom um 70%. TASK-3 und TASK-5 sind weitere Interaktionspartner von 14-3-3 (Rajan *et al.* 2002). Damit 14-3-3 an TASK-1 binden kann, muss das Motiv RRxSx von TASK-1 vorhanden sein. Kommt es zu Deletionen in diesem Bereich, ist 14-3-3 nicht mehr in der Lage an TASK-1 zu binden (Renigunta *et al.* 2006).

### **β-COP**

β-COP ist eine Untereinheit des COPI- Coatomer- Komplexes. Der COPI-Coatomer-Komplex ist z.B. für den Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zurück zum endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich. Dieser retrograde Transport von COPI-Vesikeln arbeitet mit einer bemerkenswerten Spezifität. TASK-1 wird durch β-COP im C-Terminus an den Aminosäuren K (Lysin) und R (Arginin) gebunden, wodurch der weitere Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran unterbunden wird (O'Kelly *et al.* 2002).

### **p11**

p11 gehört zur S100 Genfamilie und wird auch S100A10 genannt. Das Protein zeigt eine Interaktion mit vielen Ionenkanälen, die auf der Membranoberfläche präsentiert werden. p11 bindet an den C-Terminus von TASK-1 und verzögert dessen Transport zur Zelloberfläche. Die Region für die Interaktion zwischen p11 und TASK-1 beschränkt sich auf die Aminosäuren an Position 81-120 im C-Terminus von TASK-1. Auf der Seite von p11 ist ein di-Lysin Retentionssignal am C-Terminus verantwortlich (Renigunta *et al.* 2006).

### **Syntaxin8**

Syntaxin8 (Stx 8) ist ein SNARE Protein und kommt in der Zelle im Trans-Golgi-Netzwerk, in Endosomen, in den Lysosomen sowie in der Zellmembran vor. Wenn Stx 8 mit TASK-1 cRNS in *Xenopus* Oozyten exprimiert wird, reduziert sich der TASK-1 Strom drastisch. Für die Reduktion des Stromes ist ein kooperatives Bindungsmotiv von AP2 verantwortlich. Dieses Motiv besteht aus einem Di-Leucin

basierten Endozytose-Motiv DRRQNLL, das sich im N-Terminus von Syntaxin8 befindet und ein Tyrosin basierten Endozytose-Motiv YAEV, das im C-Terminus von TASK-1 lokalisiert ist (Renigunta *et al.* 2014).

### **Vpu**

Vpu (Viral protein U) ist ein integrales Membranprotein des HI Virus1. Es unterstützt die Virusfreisetzung während der HIV-1-Infektion und fördert den CD4 Abbau. Dieses integrale Membranprotein des HI-Virus ist ein Multimer, dass an den C-terminalen Bereich von TASK-1 bindet (Hsu *et al.* 2004). Vpu besitzt eine signifikante Sequenzhomologie mit den 80 N-terminalen Aminosäuren von TASK-1 und beeinflusst den K<sup>+</sup> Strom von TASK-1 in *Xenopus* Oozyten. Vpu verursacht einen beschleunigten Abbau des Kanalproteins. Dies deutet darauf hin, dass Vpu die normale Assemblierung von TASK-1 Untereinheiten und die Bildung von funktionellen Dimeren verhindert. Im Gegenzug reduziert TASK-1 die Freisetzung von HIV-1 Partikeln (Enyedi und Czirják 2010).

## **1.5. SCAMP -Familie**

Die Familie der Secretory carrier membrane Proteine (SCAMPs) umfasst 5 Mitglieder. SCAMP1, 2 und 3 wurden in exokrinen Drüsen entdeckt und sind ubiquitär im Körper exprimiert. Auch SCAMP4 ist ubiquitär im Körper exprimiert. SCAMPs kommen im trans-Golgi Netzwerk, Golgi Apparat und im endosomalen „Recycling compartment“ vor (Castle und Castle 2005). SCAMP5 hingegen ist nur im Gehirn speziell im Bereich der Synapse lokalisiert und in den synaptischen Vesikeln angereichert. Die zelluläre Lokalisation von SCAMP5 ist ebenfalls im Golgi Apparat, aber auch in der Plasmamembran. Weiterhin ist bekannt, dass SCAMP5 mit SNARE-Proteinen kolokalisiert ist (Han *et al.* 2010). Des Weiteren gibt es von SCAMP5 mehrere Spleißvarianten. Die in dieser Arbeit verwendete Variante besitzt eine Länge von 235 Aminosäuren (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/192683>; [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000198794;r=15:74995598-75021495;t=ENST00000361900](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000198794;r=15:74995598-75021495;t=ENST00000361900)).

Durch die Expression von SCAMP5 in neuronalen Gewebe, könnte das Protein an der Entwicklung und Reifung von Synapsen beteiligt sein (Noh *et al.* 2009). SCAMP5 wird auch mit neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie z.B.

Autismus (Castermans *et al.* 2010) oder Chorea Huntington. Bei Patienten die an Chorea Huntington erkrankt sind, wurde im Striatum eine ektopische Expression von SCAMP5 nachgewiesen (Noh *et al.* 2009). SCAMP1 ist das am häufigsten auftretende Protein der Familie und ist vor allem in synaptischen Vesikeln exprimiert. Des Weiteren wird SCAMP1 im Krebsgewebe von Pankreas und Gallenblase sowie bei Gebärmutterhalskrebs mit Lymphknoten-Metastasierung überexprimiert. Dies hat eine erhöhte Proliferation, Migration und Invasion der Zellen zur Folge (Yang *et al.* 2013). Alle SCAMPs besitzen einen prolinreichen Bereich im N-Terminus, vier Transmembran Domänen (TMD), ein E- Peptid (CWYRPIYKAFR) zwischen der 2 und 3 TMD sowie einen langen C-Terminus (Abb. 1.5.1). SCAMP1, 2 und 3 haben zusätzlich einen verlängerten N-Terminus, der ein Calcium Bindungsmotiv und drei NPF (Asparagin-Prolin-Phenylalanin) Domänen enthält (Krebs und Pfaff 2001). Es ist bekannt, dass die NPF-Domänen in der Lage sind, an EH-Domänen (Epsin Homologe Domänen) zu binden. SCAMP1 bindet über seine NPF-Domänen mindestens drei Proteine, die auch EH-Domänen enthalten, wie z.B. Intersectin, das an der Endozytose beteiligt ist,  $\gamma$ -Synergien, das bei der Vesikelbildung vom Golgi-Komplex involviert ist, sowie Eps15 (Fernández-Chacón *et al.* 2000). Die meisten EH-Domänen Proteine sind an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt. Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die SCAMPs 1, 2 und 3 an der Endozytose beteiligt sind. In dem prolinreichen Sequenzmotiv enthalten alle SCAMPs zwei klassische PXXP-Motive der Klasse 1. Dieses Motiv ist dafür bekannt, dass es ein SH3 (Src homology 3)- Bindungsmotiv ist. SCAMP3 besitzt, zusätzlich zu diesen zwei Motiven ein SH3-Bindemotiv der Klasse 2 (XPPXPX) (Wenig *et al.* 1995). Das E-Peptid, dass sich zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 befindet, ist in der Lage an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub> oder PIP<sub>2</sub>] zu binden und ist in der Exozytose involviert (Liu *et al.* 2002, Liao *et al.* 2007).

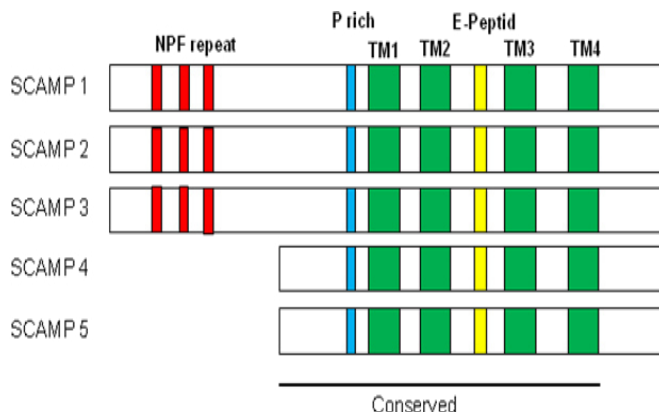


Abbildung 1.5.1: Schematische Darstellung der Secretory carrier membrane proteine (SCAMP)

SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP3 besitzen eine Größe von ca. 32- 38 kDa. SCAMP4 und 5, die einen sehr kurzen N-Terminus haben, weisen eine Größe von ca. 25 kDa auf (Han *et al.* 2010).

### 1.5.1. Interaktionspartner der Secretory carrier membrane Proteine

Alle SCAMPs sind in der Lage Homo- sowie Heterodimere zu bilden. Durch eine Heterodimerisierung z.B. von SCAMP5 und SCAMP1 ist es für SCAMP5 möglich auch indirekt mit Proteinen zu interagieren, die EH-Domänen enthalten wie Eps15. Dies erhöht die Anzahl der möglichen Interaktionen von Proteinen (Wu und Castle 1997).

#### Interaktionspartner von SCAMP1

##### Intersektin1

Intersektin1 (ITSN1) ist ein Adapterprotein, das an der clathrinvermittelten Endozytose sowie an einer Reihe biochemischer Stoffwechselwege beteiligt ist. Die prolinreichen Sequenzen von ITSN1 ermöglichen es mit Sprouty2 zu interagieren (Okur *et al.* 2011). ITSN1 ist in der Lage über seine SH3A Domäne, an Isoformen des **stable tubule-only polypeptide (STOP)** zu binden (Dmytro *et al.* 2013). Aufgrund der EH-Domäne ist Intersektin imstande SCAMP1 zu binden (Fernández-Chacón *et al.* 2000). Dieses Protein ist in Neuronen stark exprimiert und an der Entstehung neurodegenerativer Störungen, wie zum Beispiel dem Down-Syndrom oder der Alzheimer-Krankheit, beteiligt (Dmytro *et al.* 2013).

### **$\gamma$ -Synergien**

$\gamma$ -Synergien spielen eine Rolle bei der Endozytose, sowie bei dem Transport von Proteinen zwischen der Zellmembran und dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN).  $\gamma$ -Synergien enthält eine EH-Domäne (Eps15 Homologie) und mehrere Wiederholungen der Sequenz DDFX[D/E]F. Es ist in der Lage, über die EH-Domäne an SCAMP1 zu binden. Des Weiteren interagiert  $\gamma$ -Synergien mit GGA1, GGA2 und GGA3 sowie dem Adapter-Protein-Komplex AP-1 (Hirst *et al.* 2005, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UMZ2>).

### **Eps15**

Eps15 (EGFR-Signalweg Substrat Klon 15) wurde zuerst als ein endogenes Substrat der EGF1 Rezeptorkinase identifiziert. Es interagiert im AP-2 Komplex mit der AP2-alpha Untereinheit. Die Bindung von Eps15 zu AP-2 wird durch seinen C-terminalen Bereich vermittelt, während die N-terminale Region von Eps15 drei EH-Domänen enthält. Die drei EH-Domänen sind in der Lage, die NPFs von SCAMP1 zu binden (Hyman *et al.* 2000). Eps15 interagiert des Weiteren mit anderen Clathrin-Adapter Proteinen und ist auch an der Ausbildung der Clathrin pits beteiligt (Chi *et al.* 2008).

## **Interaktionspartner von SCAMP2**

### **Interaktion mit Monoamin-Transportern**

Der Dopamin-Transporter (DAT) spielt eine entscheidende Rolle bei der Wiederaufnahme des Dopamins in die Präsynapse. SCAMP2 interagiert mit dem N-Terminus des DAT und verringert so seine Expression auf der Zellmembran. In dieser Publikation wurde ebenfalls berichtet, dass SCAMP2 mit DAT in intrazellulären Vesikel-ähnlichen Strukturen kolokalisiert ist (Fjorback *et al.* 2011).

Der Serotonin-Transporter (SERT) ist ein Mitglied der SLC6 Familie der Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-abhängigen Neurotransmitter-Transportern. SERT ist für die Aufnahme von biogenen Aminen und Aminosäuren aus dem extrazellulären Raum verantwortlich. SCAMP2 interagiert mit der N-terminalen Domäne von SERT. (Müller *et al.* 2006, Fjorback *et al.* 2011).

## **NKCC2**

NKCC2 ist ein Natrium-Kalium-Chlorid (Na-K-2Cl) Co-Transporter, der ausschließlich in der Niere von Säugetieren exprimiert wird. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Salz-Wasserhaushaltes und des Blutdrucks. NKCC2 Mutationen führen zum Typ-I-Bartter Syndrom, einer lebensbedrohlichen Nierenerkrankung. SCAMP2 bindet am C-Terminus von NKCC2, blockt dessen Exozytose und fördert so den Abbau von NKCC2 in Recycling Endosomen (Zaarour et al., 2010).

## **NHE5**

$\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (NHEs) wurden ursprünglich als Plasmamembran gebundene Ionentransporter identifiziert. NHEs regulieren insbesondere den zellulären pH-Wert. Seit der Entdeckung des NHE1 wurden acht weitere Isoformen identifiziert. NHE2 bis NHE9 weisen eine 25–70% Aminosäure- Identität auf. NHE5 ist ein vornehmlich im Gehirn exprimierter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - Austauscher, welcher sich dynamisch zwischen der Plasmamembran und den Recycling-Endosomen bewegt. SCAMP2 bindet mit seinem N- und C-Terminus an NHE5. Dies führt zu einem Anstieg von NHE5 an der Zelloberfläche sowie zur Verringerung der Transportaktivität (Diering *et al.* 2009).

## **NHE7**

In Säugern wird der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher NHE7 hauptsächlich im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und in post-Golgi Vesikeln exprimiert. NHE7 ist involviert in die pH-Wert Homöostase. NHE7 ist wichtig bei der Immunantwort und der Apoptose. Der C-Terminus von NHE7 bindet an das E-Peptid von SCAMP2. Weitere Bindungspartner von NHE7 sind SCAMP1 und SCAMP5 (Lin *et al.* 2005).

## **Weitere Interaktionspartner von SCAMP2**

Die GTPase Arf6 und die Phospholipase D1 sind weitere Interaktionspartner von SCAMP2. Diese sind an der Exozytose von DCVs (dense core vesicles) beteiligt. Laut Liu *et al.* 2002, ist für diese Interaktion das E-Peptid wichtig, welches sich zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 befindet. Wenn das Tryptophan (W) an Position 202 durch Alanin (A) ersetzt wird, so wird die Exozytose von DCVs gehemmt (Liu *et al.* 2002)



## **Interaktionspartner von SCAMP5**

### **Synaptotagmin**

Synaptotagmin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Membranprotein, das an der Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt ist. SCAMP5 ist in der Lage über seine C-terminale Domäne Synaptotagmin zu binden und nimmt so Einfluss auf die Exozytose von  $\text{Ca}^{2+}$  (Han *et al.* 2010). Bei einer Inkubation der Zellen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin kann eine schnelle Translokation von hSCAMP5, das im Golgi-assoziierten Kompartiment lokalisiert ist, zur Zellmembran ausgelöst werden. In dieser Studie wird weiter berichtet, dass SCAMP5 entlang des klassischen Exozytoseweges transportiert wird (Han *et al.* 2010).

## **1.6. Intrazellulärer Transport**

In jeder Zelle werden Gene transkribiert und die daraus entstehende mRNA im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert. Nach der Translation findet die erste Überprüfung der Faltung von Proteinen und Proteinkomplexen im ER statt. Falls die Proteine falsch gefaltet sind oder sich der Proteinkomplex nicht vollständig zusammengesetzt hat, binden diese Proteine an Chaperone und werden im ER zurückgehalten. In Folge dessen kann es gegebenenfalls dazu kommen, dass der Proteinkomplex im Lysosomen durch Proteasen abgebaut wird. Bei einer ersten korrekten Faltung der Proteine werden diese je nach Signalsequenz sortiert. Besitzen die Proteine zum Beispiel ein ER Retentionssignal verweilen sie weiterhin im ER. Die Proteine, die für das Golgi-Kompartiment bestimmt sind, werden in COPII Vesikeln (Coat Protein Komplex II) verpackt. COPII ist ein Proteinkomplex der aus kleinen Ras-ähnlichen GTPase, wie z.B. aus Sar1p, Sec23, Sec24 und Sec13, Sec31 besteht. Wobei Sar1 gemeinsam mit Sec23 und Sec24 die innere Membranschicht des Mantels bilden, während Sec13 und Sec31 eine zweite äußere Membranschicht bilden (Bonifacino und Glick 2004). Die Abschnürung dieser COPII Vesikel erfolgt am glatten ER, der Bereich des endoplasmatischen Retikulum (ER), das nicht mit Ribosomen besetzt ist (Abb. 1.6.1). Dieser Bereich dient als Austrittsstelle für die Vesikel. Nach der Abschnürung der COPII Vesikel kommt es häufig zur Fusion dieser Vesikel, was zur Bildung eines vesikulären, tubulären Clusters (ERGIC) zwischen ER und Golgi führt. Dieser Cluster schnürt weiterhin Vesikel ab, welche zum Golgi-Apparat transportiert werden. Damit die Vesikel mit

dem Golgi-Apparat fusionieren können, besitzen die Vesikel v-SNARE-Proteine. Die v-SNARE-Proteine verzwirbeln sich mit den t-SNARE-Proteinen des Golgi-Apparats. Durch diese Verzwirbelung wird es den Membranen ermöglicht zu fusionieren (Bonifacino und Glick 2004, Alberts *et al.* 2004).

Sowohl im Golgi-Apparat als auch im vesikulären, tubulären Cluster werden die Vesikel teilweise mit COPI-Komplexen umhüllt. COPI dient unter anderem dem retrograden Transport von Proteinen. Dies ist ein weiterer Kontrollmechanismus, um unkorrekt gefaltete Proteine zurück zum ER zu transferieren. Die Proteine, die den Golgi-Apparat erreicht haben, werden durch Phosphorylierung und Glykosylierung modifiziert und über das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in der Zelle verteilt. Proteine, welche die Plasmamembran als Ziel haben, werden in cholesterinreichen Vesikeln von trans-Golgi versendet (Abb. 1.6.1). Durch das Cholesterin in den Lipidschichten der Vesikel wird die Membran dicker als die des Golgi-Apparates. Als Folge dessen werden nur Membranproteine zur Zellmembran über den sekretorischen Weg transportiert, die ausreichend große Transmembransegmente aufweisen (Alberts *et al.* 2004). Im weiteren Verlauf der Sortierung durch das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) müssen nicht nur Membranproteine die zur Zellmembran transportiert werden sollen von anderen Membranproteinen unterschieden werden, sondern sie müssen auch von Proteinen unterschieden werden, die für das Lysosomen oder für die sekretorische Vesikel bestimmt sind. Demzufolge werden Proteine die für das Lysosom oder für das Endosom bestimmt sind mit Mannose-6-phosphat modifiziert. Die meisten Proteine, die nicht für das Lysosom oder sekretorische Vesikel bestimmt sind, werden über den nicht selektiven sekretorischen Weg transportiert. Bei der Abschnürung der Vesikel von TGN stehen verschiedene Adaptine (AP1-4) zur Verfügung, wobei vorwiegend AP1 verwendet wird (Daboussi *et al.* 2012). Die APs sind in der Lage Clathrin zu rekrutieren. Durch die hohe Konzentration an Clathrin kommt es zur Vernetzung der Clathrinmoleküle untereinander und zur Bildung von Clathrin beschichteten Vesikeln. Für die Abschnürung der beschichteten Vesikel ist das Protein Dynamin verantwortlich (Thiele *et al.* 1997, Alberts *et al.* 2004). Der Vorgang über die Synthese von Proteinen, der Transport zur Zellmembran und die Sekretion von Substanzen wird als Exozytose bezeichnet. Für die Lebensfähigkeit einer Zelle sind die grundlegenden Mechanismen der Exozytose und der Endozytose notwendig. Der Vorgang der Endozytose wird im folgenden

Abschnitt genauer erklärt. Beide Mechanismen spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Zell-Zellkommunikation (Alberts *et al.* 2004).

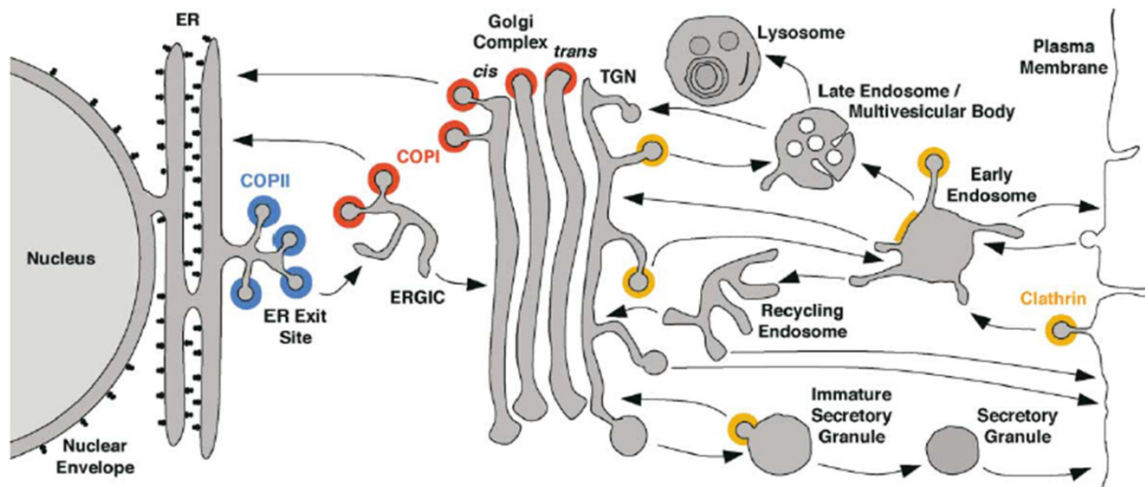


Abbildung 1.6.1: Schematische Darstellung der Kompartimente des sekretorischen, lysosomalen und endozytischen Systems. Transportschritte sind mit Pfeile gekennzeichnet. Farben zeigen die Standorte COPII (blau), COPI (rot) und Clathrin (orange) an (Bonifacino und Glick B. 2004).

## 1.7. Endozytose

Die Endozytose ist ein Prozess, der für die Aufnahme von Nährstoffen, exogenen Proteinen, Bakterien, viralen Partikel und Toxinen dient. Weiterhin spielt die Endozytose eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Zellgröße und beeinflusst die Zusammensetzung der Plasmamembran (Kim *et al.* 2012, Prosser und Wendland 2012). Endozytotische Mechanismen können funktionell in zwei Gruppen eingeteilt werden. Es gibt die clathrinabhängige und die clathrinunabhängige Endozytose. Zu der clathrinunabhängigen Endozytose gehören unter anderem die Phagozytose, Makropinozytose, Pinozytose, sowie die durch Caveolae vermittelte (caveolar/lipid raft abhängige) Endozytose (Kim *et al.* 2012, Ramanan *et al.* 2012). Auf die clathrinabhängige Endozytose wird später noch näher eingegangen. Entscheidend für die Endozytose von Proteinen ist, dass diese entsprechend markiert sind. Zum Teil besitzen die zu endozytierenden Membranproteine Endozytose-Signale in ihrer Peptidsequenz (siehe Tabelle 3). In anderen Fällen werden Interaktionspartner benötigt, welche die entsprechenden Endozytose-Signale aufweisen und so die Endozytose einleiten.

Tabelle 3: Endozytose Motive und ihre Bindungsstellen an den dazugehörigen Adapterproteinen  
Das X stellt unspezifische Aminosäuren dar, während das  $\Phi$  für eine variable sperrige, hydrophobe Aminosäure steht (Page *et al.* 1999, Madden *et al.* 2012, Mishra *et al.* 2012).

Endozytose Motive	Bindungsstellen und Adapterproteine
DPF	Bindungsstelle für $\alpha$ -Adaptin 2 (AP2)
DDFXD / EF	Ein Homolog des DPF Bindemotivs, Bindungsstelle für $\alpha$ -Adaptin 2 (AP2)
DXXLL	Dileucine-basierte Sortierungs-Motive bindet die $\mu$ Untereinheit des AP-2
[D / E] XXXL [L / I]	Dileucine-basierte Sortierungs-Motive bindet die $\mu$ Untereinheit des AP-2
FXNPXY	Phospho-Tyrosin-bindende Domäne (PTB) der Adapterproteine wie z.B. DAB2 und ARH
NPF	Epsin Homologe-Bindedomäne z.B. Eps15, Intersectin
NPxY	DH-Bindedomäne (Disabled-2 Homologe Domäne)
Yxx $\Phi$	Tyrosin-basierendes Sorting-Signal und Bindestelle für $\mu$ Untereinheit AP 2
YXX	Tyrosin-basierende Sorting-Signal und Bindestelle für $\mu$ Untereinheit AP 2

### 1.7.1. Clathrinabhängige Endozytose

Die clathrinabhängige Endozytose ist ein Mechanismus zur Bildung von endozytotischen Vesikeln, die für die Aufnahme von Proteinen, Rezeptoren und Nährstoffen verantwortlich sind. Darüber hinaus spielt Clathrin eine wichtige Rolle bei der Sortierung von Proteinen aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zum endosomalen/lysosomalen System. In den letzten Jahrzehnten wurden die komplexen molekularen Mechanismen für die Bildung und Funktion mit Clathrin umhüllten Einstülpungen (clathrin coated pits, CCP) an der Plasmamembran und an dem TGN weitgehend aufgeklärt (Guillemin *et al.* 2004, Daboussi *et al.* 2012). Wie eingangs erwähnt, benötigen Proteine wie z.B. Kanäle oder Rezeptoren bestimmte Peptidsequenzen, die signalisieren, dass diese Proteine für die Endozytose bestimmt sind. Typisches Endozytose-Signal sind beispielsweise Yxx $\Phi$  oder das DxxxLL (siehe Tabelle 3). An diese Sequenz kann das heterotetramere Protein Adaptin 2 (AP2) binden. AP2 hat mehrere Funktionen, welche über seine verschiedenen Untereinheiten gewährleistet wird. Zum Beispiel wird mit der  $\alpha$ -Untereinheit von AP2 Amphiphysin gebunden. Das Amphiphysin ist ein N-Bar Domänenprotein, das dafür sorgt, dass sich die Membran krümmt bzw. einstülpen kann. Eine weitere Funktion von AP2 ist es, ENTH (Epsin N-terminale Homologie) oder ANTH (AP180 N-terminale Homologie)-Domänen von Proteinen zu binden (Abb. 1.7.1.1). Epsin 1 ist ein ENTH-Domänen-Protein und unterstützt die Krümmung der Membran.

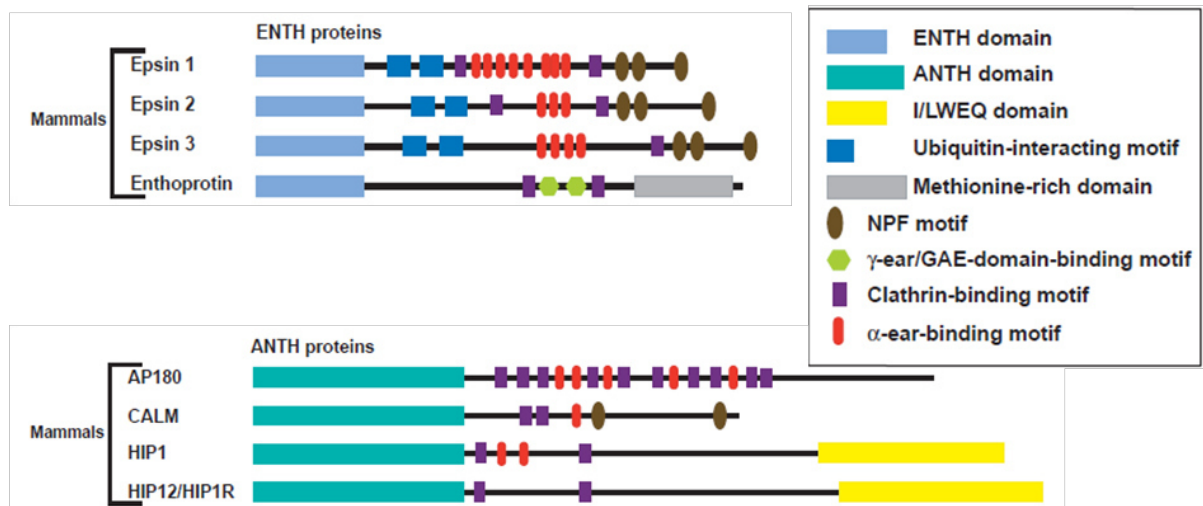


Abbildung 1.7.1.1 Schematische Darstellung von ENTH/ANTH Proteinen und ihren Bindemotiven. Das Ubiquitin-interacting Motiv (UIM) ist ein Konsensusmotiv (EDEXLxxAxxxSxxE/D), das die Interaktionen mit ubiquitinierten Proteinen vermittelt. Die Methionin-reiche Domäne, innerhalb des C-terminalen Bereichs von Enthoprotein, enthält 17% Methioninreste deren Funktion nicht bekannt ist. Die NPF Motive binden Proteine, die eine Eps15- Homologie (EH) Domänen enthalten. Die  $\gamma$ -ear/GAE-bindende Domäne besitzt die Konsensussequenz [D/E] [G/A] (0-1) F [G/A] [D/E] F, wobei F eine hydrophobe Aminosäure ist. Dieses Motiv wurde kürzlich in Enthoprotein und anderen Proteinen identifiziert. Die Clathrin-Bindungsmotive umfassen mehrere Sequenzen, welche die Clathrin Boxen Typ I und II enthalten. Für HIP1 und HIP12/HIP1R stellt das C-terminale Ende, die meisten Clathrin-Bindungsmotive. Eine weitere putative Bindungsstelle für die leichte Kette von Clathrin ist innerhalb eines verlängerten  $\alpha$ -helikalen Segments des Proteins vorhanden. An das  $\alpha$ -ear-Bindungsmotiv von Adaptin AP-2 können die DPW, DPF und FxDxF Motive binden (Guillemin *et al.* 2004).

ENTH-Domäne-Proteine und ANTH-Domäne-Proteine sind dazu in der Lage, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat PI(4,5)P<sub>2</sub> zu binden, das sich in der Membran befindet. Adapterproteine wie AP2, AP180 sowie ENTH-Domäne-Proteine rekrutieren Clathrinmonomere (Triskele) zu dem sich bildenden Endozytoseproteinkomplex. Die weitere Vernetzung der Triskelen führt zur Bildung von CCPs (Clathrin-coated pits). ENTH-Domäne-Proteine und ANTH-Domäne-Proteine, wie Epsin1 oder CLAM, enthalten NPF- Domänen, die in der Lage sind, weitere Proteine, wie z. B. Epsin 15 zu binden. Eps15 und Amphiphysin rekrutieren Dynamin, eine GTPase. Dynamin bildet eine ringförmige Struktur um den Hals des CCP. In Folge der Verengung des Ringes kommt es zur Abschnürung der Clathrin coated Vesikel (CCVs). Nach dem Abschnüren der CCVs von der Membran, werden endozytierten Proteine im endosomalen Kompartiment sortiert und entweder ubiquitiniert oder recycelt (Guillemin *et al.* 2004, Page *et al.* 1999, Ramanan *et al.* 2011).

## 1.8. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung und Verbesserung des Verständnisses der Regulierung der funktionellen Expression des  $K_{2P}$ -Kanals TASK-1 an der Plasmamembran. Nachdem in Erfahrung gebracht wurde, dass TASK-1 mit dem Secretory Carrier Membran Protein SCAMP5 interagiert, wird weiterhin in dieser Arbeit ermittelt, welche Auswirkungen dieses Protein auf den intrazellulären Transport und die Oberflächenexpression des Kaliumkanals TASK-1 hat. Aufgrund dessen, dass SCAMP5 mit anderen Mitgliedern der SCAMP Familie dimerisieren kann, wurde gleichermaßen die Rolle von SCAMP1 und SCAMP2 untersucht. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Frage, welche Aminosäuresequenzen in den SCAMPs für die Interaktion mit TASK-1 und für Regulierung der Oberflächenexpression des Kanals wichtig sind.

## 2. Materialien

### 2.1. Chemikalien und Reagenzien

30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid	Carl Roth
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Applichem, Darmstadt
10 mM dNTP Mix	Fermentas GmbH
2xYT Pulver	SERVA
Agar (Selectiv Agar)	Invitrogen
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin, Natriumsalz	Biomol, Hamburg
Calciumchlorid, Dihydrat	Merck, Darmstadt
Casein, enzym. Hydrolysat	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Δ DNS/Eco47I (Avall) Marker, 13	Fermentas GmbH
pBP322DNS (BsuRI) Marker	Fermentas GmbH
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen, Eggenstein
Dynazyme-Polymerase	Thermo Sceintific
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol, p.A.	Roth, Karlsruhe
Ethanol, techn.	Merck, Darmstadt
Ethanolamin	Roth, Karlsruhe
GelRed (10.000x in water)	Biotium
Gentamycin	Invitrogen GmbH, Darmstadt
D (+) – Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Glutathion-Sepharose	GE
Glycerin, 99,5 %	AppliChem, Darmstadt
HCL	Carl Roth
Hefeextrakt	BD Clontech
Hefe Nitrogen Base	BD Bioscience
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol, p.A.	Merck, Darmstadt

IPTG	Duchefa
JetPrime™	PEQLAB Biotechnologie GMBH
Kaliumacetat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
LB-Agar	Carl Roth
LB-Medium	Carl Roth
Luria Broth Base	Invitrogen
Lipofectamine™	Life Technologies GmbH
Magnesiumdichlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth
Mowiol 4-88	Carl Roth
Natriumacetat, Trihydrat	Appllichem, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
PBS	Life technologie™
Penicillin/Streptomycin	Boehringer, Mannheim
Pfu-Polymerase	BioLab
n-Propanol, techn.	Merck, Darmstadt
Protein Inhibitor Cocktail	Sigma, Deisenhofen
RPMI-Medium pH 7,2	Sigma, Deisenhofen
SDS	Carl Roth
Selektiver Agar	Invitrogen
T4-Ligase	Fermentas
TEMED	Carl Roth
Theophyllin	Sigma, Deisenhofen
TRIS	MP Biomedicals
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/ EDTA	PAA, The cell culture company



X-gal	Duchefa
YPD Medium	BD Bioscience

## 2.2. Geräte

Elektroporator:	MicroPulser, Biorad
Glaskapillaren (Injektion):	3,5“ Drummond Replacement Tubes, Drummond Scientific Company
Glaskapillaren (Messung):	GB150TF-8P 1,05x1,50x80mm, SCIENCE PRODUCTS
Licor:	Licor Odyssey Sa Biosciences
700 Kanal Laser Source:	Solid-State-Diodenlaser bei 685 nm
800 Kanal Laser Source:	Solid-State-Diodenlaser bei 785 nm
Detektoren:	Silicon Avalanche-Photodioden
Auflösung:	20 - 500 µm
Stromversorgung:	Automatische Spannungs-Auswahl bei 90-250 VAC und 47-63 Hz; 1,1 A bei 120 V, 200 W max
Luminometer:	Glomax 20/20 Luminometer, Promega
Mikropipettenpuller:	DMZ-Universal Puller, Zeitz
Mikromanipulator:	Nanoject II, Drummond Scientific Company
Mikroskop:	Olympus IX71 Fluoreszenzmikroskop, Olympus
Filter:	EGFP (Exciter: HQ 470/40, Beamsplitter : Q 495 LP,Emitter: CG420) Texas Red (Exciter: HQ 560/740, Beamsplitter: Q595 DCLP, Emitter: HQ 630/60) UV (Exciter: HQ 369/50, Beamsplitter : 400 DCLP,Emitter: GG420)
Kamera:	12 bit SensiCam, PCO
Software:	ImageProR Plus 4.5, Mediacybernatics
Mikroskop:	Nikon Fluoreszenzmikroskop, Olympus
Filter:	EGFP (Exciter: HQ 470/40, Beamsplitter: Q 495 LP,Emitter: CG420) Texas Red (Exciter: HQ 560/740, Beamsplitter: Q595 DCLP, Emitter: HQ 630/60) UV (Exciter: HQ 369/50, Beamsplitter: 400 DCLP,Emitter: GG420)

Kamera:	12 bit SensiCam, PCO
Software:	ImageProR Plus 4.5, Mediacybernatics
Mikroskop:	Nicon Fluoreszenzmikroskop, Eclipse Ti
Kamera:	Andor Ixon 885
Software:	NIS-Elements AR 4.00.05 NIS-Elements AR Analysis 4.00.05
PCR-Maschine:	Bio-Rad MJ Mini
Spektralphotometer:	SmartSpec® 3000, Biorad Nanodrop2000c, Thermo Scientific
Netzteil:	Electrophoresis Power Supply EPS 200, Pharmacia Biotech PS 250, Savant
Tischzentrifuge:	Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific
große Zentrifuge:	Biofuge 28 RS

## 2.3. Verwendete Bakterienstämme

<i>E.coli</i> DH5α Chemisch kompetente Zellen	Invitrogen
Genotyp	F-, <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>
<i>E.coli</i> BL21-CodonPlus <sup>R</sup> competent cells	Stratagene
Genotyp	F- <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (rB-mB-) <i>dcm</i> + Tetr <i>gal</i> <i>endA</i> Hte [ <i>argU</i> <i>ile</i> <i>Y</i> <i>leuW</i> Camr]
<i>E.coli</i> XL1-Blue Elektrokompente Zellen	Stratagene
Genotyp	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> ((F <i>I</i> <i>proAB</i> <i>lacIqZ</i> )M15 Tn10 (Tetr)))

## 2.4. Hefestämme

*Saccharomyces cerevisiae*: NMY51

Genotyp

Mobitec

MATa; his3<sup>Δ200</sup>; trp1-901;

leu2-3,112; ade2; LYS2::(lexAop)4-HIS3;

URA3::(lexAop)8-lacZ; ade2::(lexAop)8-

ADE2; GAL4],

## 2.5. Verwendete eukaryotische Zellen

### A549 – Tumorzelllinie

Diese menschliche Zelllinie wurde von D. J. Giard das erste Mal isoliert und kultiviert. Die A549-Zellen stammen aus einem alveolären Lungenkarzinom und wachsen in einer Monoschicht. Alle A549-Zellen bilden multilamellare Einschlusskörper aus, die typisch für die in Tyo-II-alveolären Epithelzellen der Lunge sind (Lieber *et. al.* 1976, [www.abcam.com/a549-human-lung-adenocarcinoma-epithelial-cell-line-whole-cell-lysate-ab7910.html](http://www.abcam.com/a549-human-lung-adenocarcinoma-epithelial-cell-line-whole-cell-lysate-ab7910.html)).

### COS7 – Zellen

Die permanente Fibroblasten - Zelllinie COS7 wurde im Jahre 1981 aus der Grünen Meerkatzer (*Cercopithecus aethiops*) isoliert. Die Zellen wurden mit einer Mutante des SV40 codierenden Wildtyp T-Antigen stabil transfiziert und wachsen in einem Monolayer ([http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e162/e1158/index\\_ger.html](http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e162/e1158/index_ger.html)).

### CHO - Zellen

Diese adhärenente epitheliale Zelllinie entstammt aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters ([http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e1883/e2047/e1953/index\\_ger.html](http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e1883/e2047/e1953/index_ger.html)).

### HeLa – Zellen

Die permanente Zelllinie HeLa besteht aus menschlichen Epithelzellen, die am 9. Februar 1951 von Chirurg Lawrence Wharton Jr. aus der Patientin **Henrietta Lacks** isoliert wurden. Diese Zellen wurden zum einen durch eine Mutation in den Humanen

Leukozyten – Antigen (HLA) auf dem Chromosom 6 und zum anderen durch den Befall des humanen Papillomavirus 18 zu Tumorzellen. Der Befall des Papillomavirus 18 verursacht den Abbau des p53-Tumorsuppressor -Proteins, während durch die Mutation im HLA schwere Chromosomenschäden nicht mehr verhindert werden können (<http://classic.the-scientist.com/2006/7/1/22/1/>).

## PC12 – Zellen

Diese Zelllinie stammt vom Ratten-Phäochromozytom, einem Tumor aus chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes. Bei diesen Zellen handelt es sich um gleichförmige, abgerundete Zellen mit nahezu diploidem Chromosomensatz von 40 Chromosomen. PC12-Zellen enthalten dichte Kern-ähnliche chromaffine Granula, die einen Durchmesser von bis zu 350 nm annehmen. Nach Zugabe von NFG (Nerven-Wachstumsfaktor) weisen diese eine neuronale Morphologie auf. Daher eignen sich diese Zellen ideal als Modellsystem für die neuronale Differenzierung (Greene *et al.* 1976).

## 2.6. Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifikation der SCAMP1- Fragmente

Forward Primer	Sequenz
hSCAMP1-Bg12	5'- GCCAGATCTATGTCGGATTTTCGAC -3'
hSCAMP1-delNPFdom	5'- GTGGCGGCCGCATGTCGGATTCTAGAACACCT -3'
hSCAMP1-del-E-pepdel	5'- CCTTGTTTCATTTGTCTTTAGATTCTTTGTA -3'
hSCAMP1 Gst.Ecor1	5'- ATAGAATTCATGTCGGATTTTCGACAGT -3'
hSCAMP1-hSCAMP5nter chi mera	5'- AGTCAACATGGTAGAAAAACAACCTTCCCACCATTG -3'
hSCAMP1 - Not1-155aa-	5'- GTGGCGGCCGCATGTTGTGGATGTTCCATGCA -3'
hSCAMP1-NPF-Sac1	5'-ATCGAGCTCAAATGTCGGATTCTAGAACACCTCCACCA-3'
hSCAMP1-Not1-	5'- ATCAGCGGCCGCATGTCGGATTTTCGAC-3'
hSCAMP1 –Sal1-	5'- ACTCAGATCTGTCTGAACCATGTCGGATTTC- 3'
hSCAMP1 –TAG-	5'- ACTCAGATCTGTCTGAACCATGTCGGATTTC- 3'
hSCAMP1 -Xho-1-	5'- AAGCCGCAGAATTAGATCGT -3'

Reverse Primer	Sequenz
hSCAMP1 –del-pepdel-	5'- TACAAAGAATCTAAAGACAAATGAACAAGG -3'
hSCAMP1- Gst.Sal1 -	5'- ATTGTCGACTTCTACAGGAATGTCTAC -3'
hSCAMP1-hSc5-	5'- CAATGGTGGGAAGTTGTTTTTCTACCATGTTGACT -3'
hSc1-Sal.1 -	5'- GATGTCGACTTAAATCTGGTACCCTT -3'
hSc1-Sca.1 -	5'- GTA CCG AGT ACT TTA AAT CTG GTT – 3'
hSc1-TAG -	5'- AAGGTCCGAGGAAAATTG – 3'

#### Oligonukleotide zur Amplifikation der SCAMP2- Fragmente

Forward Primer	Sequenz
hSCAMP 2-delNPFdom-	5'- ATCAAGCTTATGTCAGAGACAAATGCAGCG -3'
hSCAMP 2E-pepdel-	5'- CCCTGTGCCTTCCTTTTCAGCTTCTTTGTG -3'
hSCAMP 2-Gst.Sal1-	5'- ATTGTCGACATGTCGGCTTTCGACACC -3'
hSCAMP 2.Hind3-154aa-	5'- ATCAAGCTTATGTATCTGTGGATGTTGCAT -3'
hSCAMP 2-Hind3-	5'-CTCAAGCTTCGATGTCGGCTTTCGACACC -3'
hSCAMP 2-NPF-Hind3-	5'-ATCAAGCTTCGATGTCAGAGACAAATGCAGCGACAACA-3'
hSCAMP 2-Stop 284 -	5'- GTCTTCCTCCTGTAGCGGGTGCCTCC -3'
hSCAMP 2-TAG -	5'- GGGAGCTGCAGAACACEGTA -3'

Reverse Primer	Sequenz
hSCAMP 2E-pepdel-	5'- CACAAAGAAGCTGAAAAGGAAGGCACAGGG -3'
hSCAMP 2-Gst.Xho1-	5'- ATA TCGAGCTTGCATATCCGCTGGTA -3'
hSCAMP 2-Sal.1 -	5'- GATGTCGACCTAATCCCTGGAAGGC -3'
hSCAMP 2-Stop284 -	5'- GGAGTGCACCCGCTACAGGAGGAAGAC -3'
hSCAMP 2-TAG -	5'- CACTGAATGCAACATCCACA -3'

#### Oligonukleotide zur Amplifikation der SCAMP5- Fragmente

Forward Primer	Sequenz
hSCAMP 5 EcoR1-	5'- GGTGAATTCATGGCAGAGAAAGTG -3'
hSCAMP 5-E.pep-del-	5'- CCCTGCTCCTACGTCTTCAGTTTCATGGCA -3'
hSCAMP 5 –His-TAG-	5'- ATAGAATTCACCATGCATCATCACCATCACCATGCAGCG AAAGTGAACAACTTC-3'
hSCAMP 5-N-Term-Bam	5'- ATCGGATCCATGACCATGACCAAGCAAGCGCCT-3'
hSCAMP 5-N-Term-His-	5'-ATAGAATTCACCATGCATCATCACCATCACCATGCAGAG AAAGTGAACA -3'
hSCAMP 5-Stop 170-	5'- TTCATCGCCCTCTAAATGGTTCATAAA -3'
hSCAMP 5-TAG-	5'- CAGATATTCCTCCCCAGCAT -3'

Reverse Primer	Sequenz
hSCAMP 5-Sal1-	5'- GTGGTCGACTCACATCTATTGGA -3'
hSCAMP 5-E.pep-del-	5'- TGCCATGAAACTGAAGACGTAGGAGCAGGG -3'
hSCAMP5 His-	5'- CATCTCATTGGAGTACGT -3'
hSCAMP 5-Stop 170-	5'- TTTATGAACCATTTAGAGGGCGATGAA -3'
hSCAMP TAG-	5'- GAGGATGAGCCAGAGAAG -3'

### Oligonukleotide für RT-PCR

Forward Primer	Sequenz
Xenopus Levis SCAMP1-RT-	5'- TGAACCCAACAGAAGAGCCA -3'
Xenopus Levis SCAMP2-RT-	5'- TGA CTCTACACCACAGGCT -3'
Xenopus Levis SCAMP5-RT-	5'- CTTTGGCCTGGCATTCTGT -3'
Xenopus Levis GAP-DH-	5'- CTTGGCATTGTTGAGGGACTC -3'

Reverse Primer	Sequenz
Xenopus Levis SCAMP1-RT-	5'- AAATCAACTCCTCGTCCCGT -3'
Xenopus Levis SCAMP2-RT-	5'- AGCAAAGAAAGGCACAAGGG -3'
Xenopus Levis SCAMP5-RT-	5'- CGCCTGTTGTCCATTCTCT -3'
Xenopus Levis GAP-DH -	5'- GCAGGTCAGATCCACGACGGAC -3'

## 2.7. Kits

Quick Change Lightning Site Directed Mutagenesis Kit

PeqGold Gel Extraktionskit PeqLab

PeqGold Cycle Pure Kit (PCR-Purifikation) PeqLab

E.Z.N.A. Plasmid-mini-Kit Omega

QIAfilter Midi Plasmid- Präparation Kit Qiagen

mMessage mMachine® Kit, Ambion

## 2.8. Plasmide

### pBudCE4.1

Das pBudCE4.1 Plasmid (Invitrogen™, Darmstadt) ist ein 4,6 kb großer Vektor, der für die gleichzeitige Expression von zwei Genen in Säugetier-Zelllinien entwickelt wurde ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pbudce4\\_1man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pbudce4_1man.pdf)).

## pBT3-N

pBT3-N ist ein Typ II Bait-Vektor (N-terminale Fusion, Abb. 2.8.1). Die cDNAs werden mit dem C-Terminus der LexA-VP16-Cub Reporter-kassette fusioniert (z. B.: LexA-VP16-CUB-Köder) und exprimiert. Dieser Vektor ist geeignet für das Klonen von Typ II Transmembranproteinen als Köder in einen Y2H Membrane Protein System (<http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/MOB/P01310DS.pdf>).

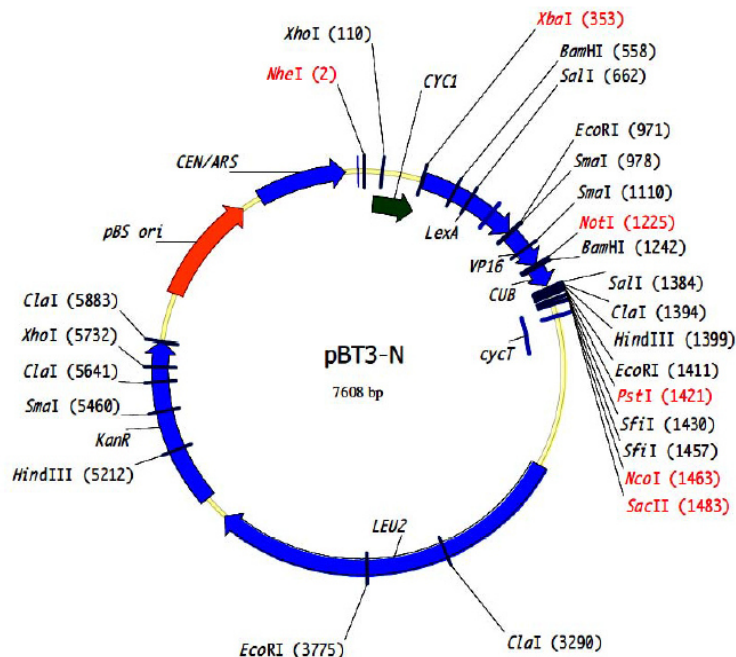


Abbildung 2.8.1: Darstellung des pBT3-N

Er enthält neben einem Reporterprotein für lacZ und His3, auch die genetische Information für den N-terminalen Anteil von Ubiquitin (Nub) <http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/MOB/P01310DS.pdf>.

## pcDNS3.1

Das pcDNS3.1 Plasmid (Invitrogen™, Darmstadt) ist ein ca. 5,4 kb großer Vektor, der für die Expression von einem Gen in Säugetier-Zelllinien entwickelt wurde (<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcDNS3.1-.pdf>).

## pcDNS3.1Topo

Der pcDNS3.1 Topo ist wie der pcDNS3.1-Vektor, für die Expression von einem Gen in Säugetier-Zelllinien entwickelt wurden. Der Vektor enthält das V5 Epitop und einen Polyhistidin-Bereich (6xHistidine) ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcDNS3.1v5histopo\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcDNS3.1v5histopo_map.pdf)).

### **pEGFP**

Das pEGFP-C3 Plasmid (Clontech, Heidelberg) enthält eine Variante vom Wildtyp des Grün-Fluoreszierenden Proteins (EGFP) mit einem Exzitationsmaximum von 488 nm und einem Emissionsmaximum von 507 nm (<http://t1domain.neusc.bcm.tmc.edu/basevectorseqs/pegfp-c1mapmcs.pdf>).

### **pDsRed-Monomer-C1**

Das pDsRed-Monomer-C1 Plasmid (Clontech, Heidelberg) enthält das DsRed-Monomer (DsRedM1) mit einem Exzitationsmaximum von 557 nm und einem Emissionsmaximum von 585 nm ([http://www.clontech.com/DE/Products/Fluorescent\\_Proteins\\_and\\_Reporters/Fluorescent\\_Proteins\\_by\\_Name/DsRed-Monomer\\_Fluorescent\\_Protein?sitex=10024:22372:US](http://www.clontech.com/DE/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Fluorescent_Proteins_by_Name/DsRed-Monomer_Fluorescent_Protein?sitex=10024:22372:US)).

### **pmCherry-C1**

Das pmCherry-C1 Plasmid (Clontech, Heidelberg) enthält eine mutierte Variante des DsRed-Monomer (DsRedM1) ([www.clontech.com/US/Products/Fluorescent\\_Proteins\\_and\\_Reporters/Fluorescent\\_Proteins\\_by\\_Name/mCherry\\_Fluorescent\\_Protein](http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Fluorescent_Proteins_by_Name/mCherry_Fluorescent_Protein)).

### **pGEX-4T-1**

pGEX-4T-1 eignet sich für die Expression von Proteinen in E.coli BL21 (<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/de/GELifeSciences/28954549>).

### **pJet-blunt**

pJet-blunt dient zur einfachen Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Endungen (<http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/k1230-product-information.pdf>).



### pPR3-N

Der pPR3-N ist der DNS-Bibliothek Vektor (NubG-cDNS-Orientierung, Abbildung 2.8.2). Die cDNS-Sequenzen oder cDNS-Bibliotheken werden als Fusionen an den C-Terminus von NubG exprimiert. Die Expression wird durch den schwachen CYC1-Promotor gesteuert

(<http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/MOB/P01310DS.pdf>).

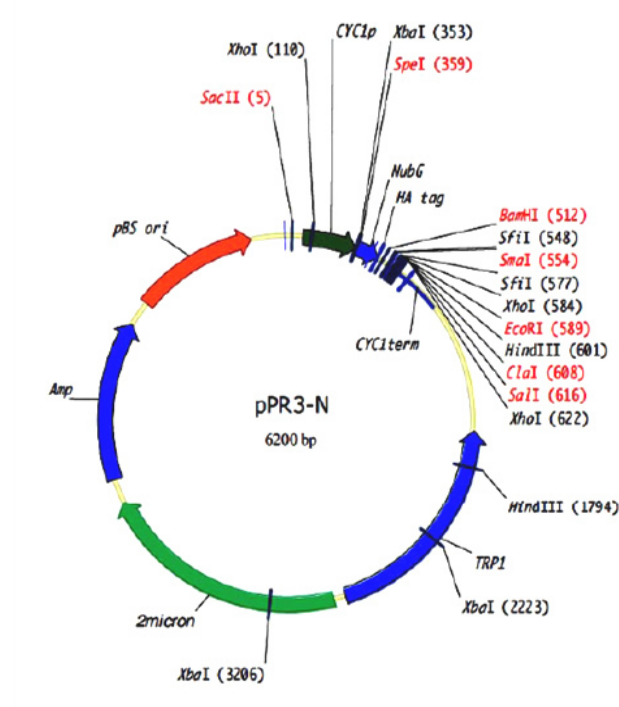


Abbildung 2.8.2: Der Vektor enthält die Sequenzen des C-terminalen Anteil von Ubiquitin (Cub) und den des auxotrophen Marker Tryptophan

(<http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/MOB/P01310DS.pdf>)

## pSGEM

pSGEM (Abb. 2.8.3) ist ein 3,1 kb großer Vektor, der auf dem Plasmid pGM3-z basiert. pSGEM enthält eine 3' und 5' UTR (untranslatierte Region) für das Xenopus  $\beta$ -Globin Gen, welches die die MCS flankieren. In der 5' UTR befindet sich der T7 Promotor und in der 3' UTR eine Restriktionskassette für 4 Enzyme (NheI, SphI, PacI und SfiI) die der Linearisierung des Vektors dienen sowie ein SP6-Promotor. Dieser Vektor wurde in dieser Arbeit zur Herstellung von cRNS verwendet.

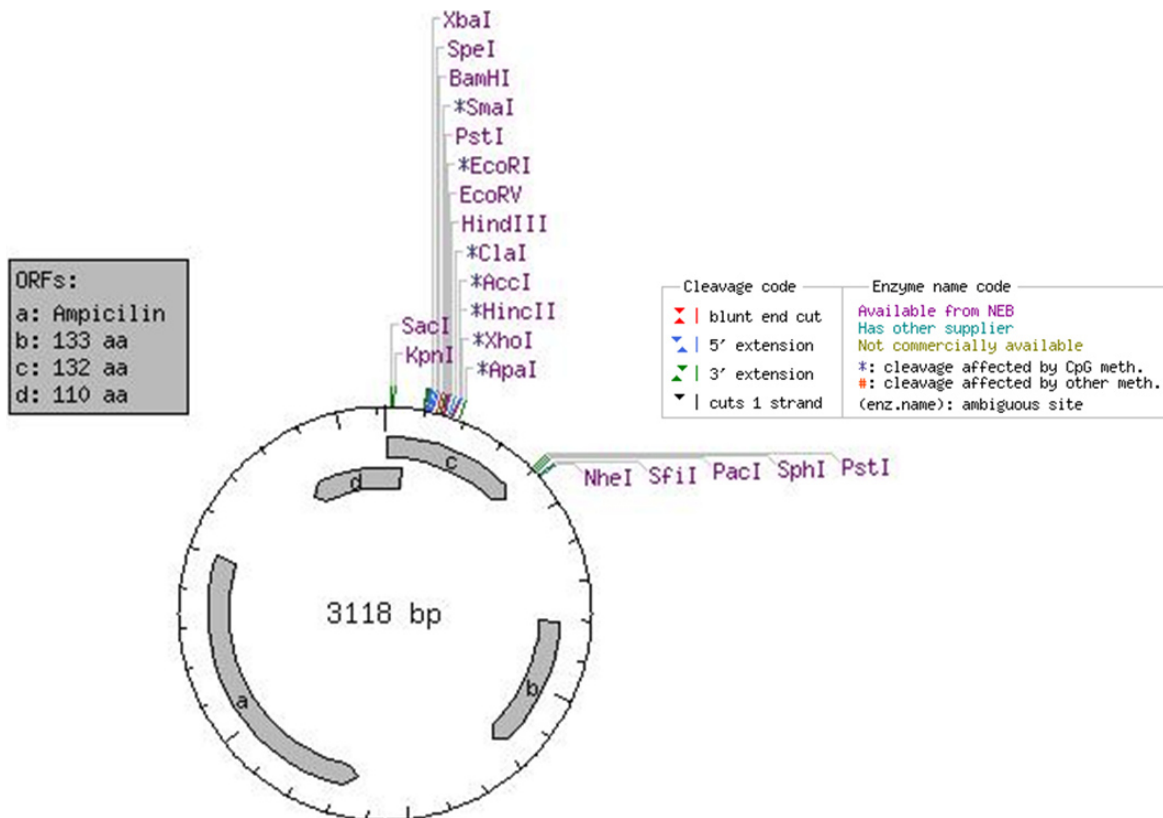


Abbildung 2.8.3: Plasmid pSGEM, Amp: Ampicillinresistenzgen, b: Replikationsursprung des Plasmids in Bakterien, c: Multicloningsite

## 2.9. Antikörper

### Erstantikörper

Antikörper	Art des Antikörpers	Firma
Anti-CD8	rabbit polyklonal IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-cMyc	mouse monoklonal IgG	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GFP	mouse monoklonal IgG <sub>2</sub>	Santa Cruz Biotechnology
Anti-HA	rat monoklonal IgG	Roche
Anti-HA	mouse monoklonal IgG	GE Healthcare
Anti-SCAMP1	mouse monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SCAMP2	mouse monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SCAMP2	Goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SCAMP2	rabbit polyclonal	Acris Antibodies GmbH
Anti-SCAMP5	rabbit polyclonal	Abcam
Anti-TASK-1	rabbit polyclonal	alomone labs

### Zweitantikörper

Antikörper	Art des Antikörpers	Firma
IRDye 800 CW	Donkey Anti-Goat	92632214D Li-Cor
IRDye 800 CW	Goat Anti-Mouse	92632210D Li-Cor
IRDye 800 CW	Goat Anti-Rabbit	92632211D Li-Cor
IRDye 680 LT	Goat Anti-Mouse	92668020D Li-Cor
IRDye 680 LT	Goat Anti-Rabbit	92668021D Li-Cor
Alexa 488 Donki	Anti-Rabbit	Invitrogen™
Alexa 488 Chicken	Anti-Mouse	Invitrogen™
Alexa 594 Chicken	Anti-Mouse	Invitrogen™
Alexa 594 Rabbit	Anti-Mouse	Invitrogen™

### 3. Methoden

#### 3.1. Molekularbiologische Methoden

Bevor mit der molekularbiologischen Arbeit begonnen werden konnte, wurde die Laborbank mit 70% (v/v) Ethanol oder Terralin desinfiziert. Alle benötigten Materialien wurden entweder steril bezogen, mit 70% (v/v) Ethanol behandelt oder bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Kontaminierte Geräte oder Materialien wurden sterilisiert oder mit 70% (v/v) Ethanol behandelt.

##### 3.1.1. Medien, Puffer und Lösungen

Alle für molekularbiologische Arbeiten verwendeten Lösungen wurden mit Milli Q-Wasser angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden in Analysenqualität bezogen.

- Ampicillin- Stammlösung [100 mg/ml]

Komponente	Menge
Ampicillin	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	10 ml

Die Ampicillin-Stammlösung wurde steril filtriert und in Portionen zu 1 ml bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

- DMEM-Medium

DMEM ist ein Nährmedium für humane und verschiedene tierische Zellen, das von der Firma Gibco sterile bezogen wurde.

Komponente	Menge/Konzentration
DMEM (Gibco)	500 ml
FCS	10 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml

Das gebrauchsfertige Medium wurde bei 4°C gelagert.

- 0,5 M EDTA- Stammlösung (pH=8,0)

Komponente	Menge/Konzentration
EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	93,05 g
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	500 ml
Der pH-Wert wurde mittels einer 10 M NaOH – Lösung auf 8,0 eingestellt	

Nach dem Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 20 min wurde die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

- FCS

Das steril bezogene FCS wurde für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Nach der Hitzeinaktivierung wurde das FCS in 50 ml Falkons fraktioniert. Die gebrauchsfertige 50 ml FCS-Fraktion wurde bei -20°C gelagert.

- G 418-Stammlösung (50 mg/ml)

Diese Lösung wurde von der Firma Invitrogen GmbH steril bezogen und je nach Ansatz entsprechend verdünnt.

- Kanamycin-Stammlösung (70 mg/ml)

Komponente	Menge
Kanamycin	700 mg
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	10 ml

Die Kanamycin-Stammlösung wurde steril filtriert und in Portionen zu 1 ml bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

- 3M K/ 5M OAc

Komponente	Menge
5M Kalium – Acetat Lösung	60,0 ml
Eisessigsäure	11,5 ml
Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	28,5 ml

- LB-Medium

Komponente	Menge/Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

Je nach Bedarf wurde Kanamycin (70 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben.

- LB- Agar

Komponente	Menge/Konzentration
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

Je nach Bedarf wurde Kanamycin (70 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben. Anschließend wurde die Lösung in Petrischalen gegossen und bei 4°C gelagert.

- LiOAc/TE Master Mix für ein Screening

Komponenten	Mengen
LiOAc (Sigma),	1,1 ml
10x TE pH 7,5	1,1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	7,8 ml

- Mowiol 4-88

Komponente	Menge
Glycerin	6,0 g
Mowiol 4-88	2,4 g
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	6,0 ml
0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)	12,0 ml

Der Ansatz erfolgte entsprechend der Gebrauchsanweisung von Roth. Das Mowiol 4-88 wurde in Glycin unter rühren für 1h bei RT gelöst. Im zweiten Schritt wurden 6 ml steriles H<sub>2</sub>O<sub>Milli Q</sub>, dazu gegeben und unter gleichen Bedingungen für 1h inkubiert. Anschließend wurde 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) zugegeben und bei 50°C für 2h inkubiert. In dieser Zeit wurde der Ansatz alle 20 min durch einen Magnetrührer gemischt. Bei nicht vollständigem Lösen des Mowiols wurde der Ansatz bei 5000 g für 15 Minuten sedimentiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert.

- 0,2N NaOH/ 1%SDS Solution (für 12 Ansätze)

Komponente	Menge
10 N NaOH	100 µl
10% SDS	500 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	4,4 ml

- ND 96 Puffer

Komponente	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	18 mM
MaCl <sub>2</sub>	10 mM
HEPES (Sigma)	50 mM

In 1l H<sub>2</sub>O<sub>Milli Q</sub> gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

- ND 96 Aufbewahrungslösung

Komponente	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	18 mM
MaCl <sub>2</sub>	10 mM
HEPES (Sigma)	50 mM
Natriumpyruvat (Sigma)	2,5 mM
Theophyllin (Sigma)	90 mg/l
Gentamycin (Sigma)	20 µg/l

In 1l H<sub>2</sub>O<sub>Milli Q</sub> gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

- 1x PBS

Komponente	Konzentration
NaCl	8 g/l (140 mM)
KCl	0,2 g/l (3 mM)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g/l (8 mM)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l (1,5 mM)

Der pH-Wert wurde auf 7,2-7,4 eingestellt.

Steriles PBS für die Zellkulturen wurde von der Firma Life Technologie™ bezogen.

Das PBS wurde dann bei Raumtemperatur gelagert.

- PEG/LiOAc Master

Hefe-Transformation	für ein Screening	Komponenten
240 µl	12 ml	PEG 50% (Sigma)
36 µl	1,5 ml	LiOAc (Sigma)
25µl	1 ml *	denaturiertes Lachssperma
-	1,5 ml	10x TE pH 7,5

\* Für einen Hefe-Screen muss frisch denaturiertes Lachssperma verwendet werden

- RPMI-Medium

RPMI ist ein Nährmedium für Humane und verschiedene tierische Zellen.

Komponente	Menge/Konzentration
RPMI (Sigma )	500 ml
FCS	5 % (v/v)
Pferdeserum	10 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml

Das gebrauchsfertige Medium wurde bei 4°C gelagert.

- SCE Solution

Komponenten	M	Masse in g
Sorbitol	1 M	18,2 g
Sodium citate pH 7,6	0,1 M	2,94 g
EDTA	0,06 M	2,23 g
Aufnahme der Substanzen in 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>		

Je nach Anzahl der Hefe-Minipräparationen, wurde die SCE Solution mit Zymolyase und 2 β- Mercaptoethanol versetzt.

Anzahl der Minis	SCE	/Zymolyase	/2ME (β-Mercaptoethanol)
5	1,25 ml	15 µl	2,5 µl
10	2,5 ml	30 µl	5 µl
25	5 ml	60 µl	10 µl
50	10 ml	120 µl	20 µl



- SD- Agarplatten

Komponenten	Konzentration
SD Minimal Medium (Clontech)	27 mg/l
Agar (Invitrogen)	15 g/l

Je nach Bedarf wurde zusätzlich Dropout Mix (Clontech) hinzugegeben, um SD-L, SD-LW, SD-LWH und SD-LWAH herzustellen.

	SD -L	SD -LW	SD -W	SD-LWHA
Dropout Mix (Clontech)	690 mg/l	640 mg/l	740 mg/l	600 mg/l

Die Sterilisierung erfolgte über Autoklavierung. Erst während diesem Schritt löste sich der Agar. Die Lösung wurde in Petrischalen gegossen und bei 4°C gelagert.

- 50 × TAE-Puffer:

Komponente	Konzentration
TRIS	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0 (eingestellt mit NaOH)	

- TE-Puffer (pH=8,0) [10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA]

Komponente	Menge
Tris/HCl-Stammlösung [1 M, pH = 8,0]	5 ml
EDTA Stammlösung [0,5 M, pH = 8,0]	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	ad. 500 ml

Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

- TFB1

Komponente	Menge/Konzentration
Kaliumacetat	30 mM
CaCl <sub>2</sub> Dihydrat	10 mM
MnCl <sub>2</sub> Tetrahydrat	50 mM
RbCl	100 mM
Glycerol	15%

- TFB2

Komponente	Menge/Konzentration
Mops	100 mM
CaCl <sub>2</sub> Dihydrat	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerol	15%

- 1M Tris/HCl- Stammlösung (pH=8,0)

Komponente	Menge/Konzentration
Tris-Base	60,55 g
H <sub>2</sub> O <sub>Milli Q</sub>	500 ml
pH-Wert mittels 37% (v/v) HCl auf pH 8,0 eingestellt	

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

- Triton X-100 Lysepuffer

Komponente	Konzentration
Triton X-100	1% (v/v)
NaCl	150 mM
TRIS	50 mM
Protease-Inhibitor- Cocktail	10 UI/ml

- Trypsin/EDTA - Arbeitslösung [0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA]

Die Lösung wurde steril und gebrauchsfertig von der Firma PAA, cell culture company bezogen.

- YPAD-Medium (10 g/l Casein, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl)

Komponente	Konzentration
YPD-Broth	50 g/l
Adeninsulfat	40 mg/l

Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.2. Hefe-Zwei-Hybrid-Split-Ubiquitin-System

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (NMY51) ist in der Lage zwei Plasmide aufzunehmen. Dieser Umstand ermöglicht es der Wissenschaft die Hefe für eine Methode zu verwenden, die es erlaubt, effizient nach Proteininteraktionen von Membran-assoziierten-Proteinen und von integralen Membranproteinen (Thaminy et al., 2004) zu suchen. Bei diesem System handelt es sich um das Hefe-Zwei-Hybrid-Split-Ubiquitin-System (Mobitec). In diesem System wird Ubiquitin, das für den Abbau und das Recycling von Proteinen verantwortlich ist, in zwei Segmente geteilt. Der C-terminale Anteil Cub wird auf dem Ködervektor pBT3N kodiert. Des Weiteren kodiert dieser Vektor die Reportergene für LexA, VP16 und einen auxotrophen Marker, der für Leucin kodiert. Der Plasmid pPR3N (Beutevektor), enthält den N-terminalen Ubiquitin Anteil Nub. Durch eine Punktmutation im Nub wurde die Aminosäure Isoleucin (I) durch Glycin ersetzt. Die Folge dieser Mutation ist, dass die zwei Segmente von Ubiquitin ihre Affinität verlieren und somit die spontane Vereinigung von Nub und Cub nicht mehr möglich ist. Dieser Vektor enthält auch die kodierenden Sequenzen eines weiteren auxotrophen Markers, der für Tryptophan kodiert. Dieser auxotrophe Marker ermöglicht es zu erkennen, ob die Hefe beide Plasmide aufgenommen hat oder nicht. Startet man einen Screen zur Identifikation neuer Interaktionspartner z. B.: für den  $K_{2P}$ -Kanal TASK-1, wird dieser in den pPT3N Vektor kloniert. Die vermuteten Interaktionspartner oder die cDNS-Bibliothek werden in den pPR3N Vektor kloniert. Nach der Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* (NMY51), startet die Proteinsynthese der zwei Fragmente Nub und Cub sowie der beiden bait und pray Proteine. Durch die Punktmutation im Nub, können die beiden Fragmente sich nur zusammenlagern, wenn ihre Fusionspartner miteinander interagieren. Sobald Nub und Cub in räumliche Nähe zueinander kommen, erkennt die Zelle die Interaktionspartner als ubiquitiniert. Die Folge ist der Abbau und das Recycling der Proteine durch die Ubiquitin-spezifische Protease UBP. Durch den Abbau der Fusionsproteine werden auch die Reporterproteine LexA und VP16, die an Cub fusioniert wurden, abgespalten. Die freigesetzten Transkriptionsfaktoren aktivieren nun die Gene ADE2, HIS3 und LacZ. Aufgrund der Aktivierung dieser Gene ist *Saccharomyces cerevisiae* (NMY51) in der Lage Alanin und Histidin zu synthetisieren. Demzufolge können nur die Hefe-Zellen auf den Selektivmedium ohne Histidin und Adenin (-LWHA) wachsen, deren Plasmide für Interaktionspartner kodieren. Die Hefen, deren Plasmide nicht für Interaktionspartner

kodieren, können nur auf Leucin- und Tryptophan freiem Selektivmedium (-LW) wachsen. Mit dem Galactosidase-Assay (X-Gal) kann die Aktivierung des LacZ-Gens nachgewiesen werden. Als positive Kontrolle wurde, wie im Kit von Mobitec beschrieben, pAI-AI5g verwendet. Als negative Kontrolle wurde pDL2-Alg5 verwendet ([http://www.mobitec.de/de/products/bio/01\\_2H\\_sys/index.php?y2h.html](http://www.mobitec.de/de/products/bio/01_2H_sys/index.php?y2h.html)).

### **Hefetransformation**

Bevor die Hefe transformiert werden konnte, musste eine Übernachtskultur von 50 ml YPAD-Hefe-Medium mit einem Hefeklon des Stammes NMY51 (Mobitec) angeimpft und bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert werden. Am darauffolgenden Tag wurde mit der Übernachtskultur 50 ml YPAD-Medium angeimpft und eine optische Dichte<sub>(600nm)</sub> (OD) von 0,2 eingestellt. Die Inkubation der Flüssigkultur fand bei 30°C und leichtem Schütteln statt, bis ein OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Sobald die optische Dichte<sub>(600nm)</sub> von 0,6 erreicht war, befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, dies stellte den besten Zeitpunkt für die Transformation der Hefen dar. Im darauf folgenden Schritt wurden die Zellen bei 15 Minuten (Min) bei 2.500 x g (2500rpm bei einem Rotorradius von 36 cm) sedimentiert und mit 2,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> resuspendiert. Während des Zentrifugationsschrittes wurde der Mastermix aus Polyethylenglycol (PEG)/Litiumacetat (LiOAc) angesetzt. Zu 0,6 µg Plasmid-DNS (bait- und prey- DNS) wurden 300 µl des Mastermixes in ein Reaktionsgefäß gegeben und gut resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl Hefe-Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt, gut gemischt und 45 min bei 42° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze bei 400 x g für 5 min sedimentiert und das Pellet in 100 µl einer 0,9%-igen NaCl-Lösung resuspendiert. Die Ansätze wurden anschließend unter der Sterilbank auf SD-Minimalnährböden (SD: synthetic dropout) ausgestrichen. Zur Herstellung der SD-Agarplatten wurde ein Mix mit den entsprechenden Aminosäuren verwendet. Die Platten wurden bei 30°C für 3-4 Tage inkubiert.

### **Hefe-Spotting**

Wurden die zwei Vektoren von der Hefe aufgenommen, sind die Klone in der Lage auf SD-LW-Minimalmedium zu wachsen. Um zu überprüfen, ob die zwei kodierten Proteine eine direkte Interaktion aufwiesen, wurden die Hefekolonien auf SD-LWHA-Minimalmedium gespottet. Hierfür wurden je 5-10 Hefeklone pro Konstrukt in 50 µl

einer 0,9%-igen NaCl-Lösung resuspendiert. Von der Resuspension wurden anschließend je 2-3 µl auf eine neue SD-LW und eine SD-LWHA Minimalmediumplatte gespottet. Die SD-Platten wurden 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert und ausgewertet.

### **X-Gal-Assay**

Die Plasmide, die bei der Hefetransformation zur Untersuchung von Proteininteraktionen verwendet werden, kodieren auch für ein lacZ-Gen. Mithilfe dieses Gens ist die Hefe in der Lage, die bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase zu exprimieren, sofern eine Interaktion der Proteine stattfindet. Dieses Enzym kann Laktose in Galaktose und Glukose spalten, in dem es die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung aufricht. Im X-Gal-Assay wird das 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal) verwendet, welches dieselbe Bindungsform besitzt wie die Laktose. Wird X-Gal durch das Enzym gespalten, tritt eine blaue Färbung ein (Itahana et al., 2007). Für diesen Assay wurden die Hefekolonien auf ein Filterpapier übertragen und mit flüssigem Stickstoff für 5 min fixiert. Das Filterpapier wurde danach für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit Agar, welcher in 1x phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst und X-Gal enthielt, überschichtet. Die Hefekolonien färbten sich nur dann blau, wenn die Hefen die  $\beta$ -Galaktosidase exprimierten. Anhand der Anzahl der gefärbten Kolonien und deren Farbintensität konnte die lacZ-Expression quantifiziert werden.

### **Hefe–Minipräparation**

Durch das Vereinzeln der Hefekolonien konnten gezielt die Kolonien ausgewählt werden, welche für Proteine kodieren, die eine direkte Interaktion mit dem Köderprotein aufwiesen. Von diesen Kolonien wurde eine 3 ml Hefekultur in Selektivmedium angesetzt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Sedimentation erfolgte bei 5000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur. Das Pellet wurde im darauf folgenden Schritt in 200 µl SCE / Zymolyase/2ME-Lösung resuspendiert und für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 400 µl 0,2N NaOH/ 1%SDS Lösung zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden 300µl 3M K/ 5M OAc zugegeben und durch mehrmaliges invertieren gemischt. Es erfolgte erneut eine 5-minütige Lagerung des Ansatzes auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz bei

Raumtemperatur für 4 min und 13.300 rpm pelletiert. 500 µl des Überstandes wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol und 30 µl Na-Acetat gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz bei 13.300 rpm sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Zum Entfernen des Alkohols, erfolgte eine finale Zentrifugation bei 13.300 rpm. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die Resuspension des Pelletes erfolgte in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub>. Um im weiteren Schritt elektrokompetente *E. coli*-Zellen zu transformieren, wurden 5 µl der aufgereinigten Plasmid-DNS verwendet.

### 3.3. Kultivierung von E.coli

Für die Vermehrung der Plasmid-DNS wurden die Stämme *Escherichia coli* DH5α (*E.coli* DH5α) und *Escherichia coli* XL-blue (*E.coli* XL-blue) verwendet.

*E. coli* wurde bei 37 °C auf Agarplatten im Brutschrank kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden mit Hilfe einer Impföse oder einer sterilen 100 µl Pipettenspitze mit einer isolierten Kolonie von einem Vereinzelausstrich angeimpft und ebenfalls bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Um eine Kultur mit einem Volumen von 50 ml anzuimpfen, wurde als erstes *E. coli* mit dem entsprechenden Plasmid elektrisch transformiert. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die 50 ml direkt mit dem kompletten Ansatz angeimpft. Dem verwendeten LB-Medium wurde stets Antibiotikum zugefügt, welches dem zu transformierenden Plasmid entsprach.

#### 3.3.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Da von Natur aus nur wenige Bakterienstämme DNS aus der Umgebung aufnehmen, müssen die Bakterien chemisch behandelt werden, um ihre Kompetenz, die Fähigkeit DNS aus der Umgebung aufzunehmen, zu erhöhen.

Zu Beginn wurden die *E.coli* XL-1 oder *E.coli* DH5 α auf einer LB- Agarplatte ausgesät. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht, wurde eine Kolonie von der Platte aufgenommen, in 2,5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:100 verdünnt. 2 ml der Verdünnung wurden in 200 ml LB Medium überführt, das 20 mM MgSO<sub>4</sub> enthielt. Die Bakterien wurden in einem 1l-Kolben bei 37 °C inkubiert, bis ein OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war. Nach Erreichen des gewünschten OD-Wertes wurden die Zellen bei

4500 x g für 10 min und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 80 ml (2/5 des originalen Volumen) in eiskaltem TFB1 resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden auf Eis für 15 min inkubiert. Die darauf folgende Sedimentation erfolgte bei 4500 x g für 10 min und 4 °C. Die Zellen wurden dann vorsichtig in 1/25 des originalen Volumens in eiskaltem TFB2 resuspendiert. Nach der Resuspension wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, in Reaktionsgefäßen zu je 100 µl aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

### **3.3.2. Herstellung elektrisch kompetenter Zellen**

Eine Übernachtskultur von 50 ml wurde mit *E.coli* XL1-blue Zellen angeimpft. Mit Hilfe dieser Übernachtskultur wurde am nächsten Tag eine Kultur von 400 ml LB-Medium angesetzt. Dabei wurde die OD<sub>600</sub> auf 0,2 eingestellt. Die Kultur wurde bei 37°C schüttelnd inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht wurde. Zur Sedimentierung der Zellen wurde die Kultur auf 4 Ansätze aufgeteilt und bei 1.200 x g pelletiert. Die Pellets wurden in 50 ml kaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach erneutem sedimentieren wurden die Zellen in 25 ml kaltem 10% Glycerol resuspendiert. Dieser Vorgang wurde erneut wiederholt und das Pellet in 15 ml kaltem 10% Glycerol resuspendiert. Um das Glycerol soweit es geht zu entfernen, wurde ein abschließender Zentrifugationsschritt durchgeführt. Das Glycerol wurde verworfen und die Zellen im restlichen Überstand resuspendiert. Die Zellenlösung wurde in 100 µl Aliquotierten aufgeteilt, welche bei -80° C eingefroren wurden.

### **3.3.3. Chemische Transformation von Bakterien**

Mit Hilfe der Transformation werden Plasmide in kompetente Bakterien eingeschleust. Durch die Ausplattierung der transformierten *E. coli* auf Antibiotika haltigen Agar- Platten erreicht man eine Vereinzelung der transformierten Klone. Die Plasmide enthalten eine Antibiotikaresistenz, weshalb nur die Bakterienkolonien auf der Agar- Platte wachsen können, die das Plasmid aufgenommen haben.

Für die Transformation von DNS wurden entweder kompetente Zellen des *E. coli*- Stammes XL blue oder DH5a verwendet, die auf Eis aufgetaut wurden. Die zu transformierenden Plasmide wurden jeweils zu 100 µl der kompetenten Bakteriensuspension dazugegeben und vorsichtig gemischt. Die Transformationsansätze wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt

bei 37°C für genau 60 sec. Anschließend wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden mit 900 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach der Inkubation bei 37°C wurden die Zellen bei 13000 rpm für 1 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 100 µl LB-Medium aufgenommen und je nach Resistenzgen der Plasmide auf Selektiv- Agarplatten ausplattiert. Die Selektiv-Agarplatten waren mit Antibiotikum versetzt, so dass nur die transformierten Bakterien in der Lage waren zu wachsen.

#### ***Durchführung der Transformation von Ligationsansätzen:***

Die Transformation von Bakterien mit einem Ligationsansatz gleicht dem der chemischen Transformation von Bakterien. Der Unterschied liegt hierbei in der eingesetzten DNS-Menge. Während bei der Transformation von Ligationsansätzen der ganze Ansatz verwendet wurde, wurde bei der chemischen Transformation nur ca. 1 ng DNS eingesetzt. Als Kontrolle für die Transformation diente der hydrolysierte, dephosphorylierte Vektor, ohne Insert. Bei der Negativkontrolle sollten keine bzw. nur sehr wenig Kolonien auf den Agar - Platten vorhanden sein. Zur Analyse wurden die transformierten Bakterienkolonien in 2 ml LB- Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

#### **3.3.4. Elektrische Transformation von Bakterien**

Um eine hohe Transformationsrate von Bakterien mit großen Plasmiden, z. B. aus der Hefe zu gewährleisten, wurde die Methode der Elektroporation angewandt. Bei dieser Methode wurden elektrisch kompetente *E.coli* des Stammes XI1-blue verwendet. Nach dem Auftauen der Zellen wurde die DNS zugegeben und der Ansatz unter Spannung gesetzt. Dies führt zu Löchern in den Zellwänden der Bakterien, die es ermöglichen, dass die DNS aufgenommen wird. Dafür wurde der Ansatz aus Plasmid und kompetenten *E.coli* XI1-blue in eine spezielle Küvette (Peq-Lab) überführt und mittels einer Stromquelle (Bio-Rad) ein Stromstoß initialisiert. Anschließend wurden die Zellen in 900 µl LB-Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C inkubiert. Entweder wurden die transformierten Bakterien, wie bei der chemischen Transformation weiter behandelt oder die 900 µl mit den Transformanten wurde in ein 50 ml Selektiv-LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin: 70 µg/ml) überführt.



### 3.3.5. Plasmidisolierung

Um die transformierten Bakterien nach positiven Plasmidträgern zu untersuchen, wurde eine analytische Plasmidisolierung durchgeführt. Zur Plasmidisolierung wurde das E.Z.N.A. Plasmid-mini-Kid von Omega verwendet. Zur Überprüfung, ob das richtige Insert vorhanden war, wurde eine analytische Hydrolyse und anschließende Sequenzierung durchgeführt.

Nachdem durch die analytische Plasmidisolierung die Klone mit dem entsprechenden Insert identifiziert wurden, konnte eine präparative Plasmidisolierung durchgeführt werden. Die präparativen Plasmidisolierungen dienten der Gewinnung hochreiner Plasmid-DNS, die zur Klonierung und Transfektion von humanen Zellen eingesetzt wird. Für die Plasmidisolierung wurde das QIAfilter Midi Plasmid-Präparation Kit von Qiagen verwendet.

Die Plasmidisolierungen wurden wie im Kit beschrieben durchgeführt.

Zur Konzentrationsbestimmung sowie zum Untersuchen der Reinheit der DNS wurde der Spektralphotometer Nanodrop verwendet. Nach Bestimmung der Konzentration wurde das Eluat bei -20°C gelagert.

### Bestimmung der DNS-Konzentration und Reinheit

Legende:  $c$ =DNS Konzentration für RNS/ dsDNS

$f$ =Verdünnungsfaktor

$n = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}_{\text{DNS}}$

$n = 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}_{\text{RNS}}$

Nach der präparativen Plasmidisolierung wurden die Konzentration und die Reinheit der DNS über ein Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt. Hierbei wurde 1  $\mu\text{l}$  der Plasmid- Lösung direkt auf den Messfühler der Apparatur gegeben. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280 \text{ nm}$  und  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Als Referenz wurde der Puffer aus dem Kit verwendet, mit dem die Plasmid-DNS von der Säule eluiert wurde. Die DNS-Konzentration berechnet sich aus der folgenden Formel:  $c = OD_{260} \cdot f \cdot n$ . Hierbei entspricht eine Einheit der optischen Dichte einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Dies wurde automatisch von dem Gerät vorgenommen. Die Reinheit der

Plasmid-Präparation wird über den Quotienten  $A_{260} / A_{280}$  bestimmt. Liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0 spricht man von einer reinen DNS-Präparation (<http://www.molekuelkueche.de/DE/methods/DNSConcentration.html>).

### 3.3.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine standardisierte Methode, die für die Vervielfältigung spezifischer DNS-Fragmente genutzt wird. Je nach Design der Primer, ist es möglich, über diese Methode Punktmutationen (Mutagenese PCR) und Schnittstellen für Restriktionsenzyme in die DNS einzufügen. Des Weiteren ermöglicht die Fusions-/Überlappungs-PCR zwei große DNS-Fragmente zu fusionieren. Die Fusions-PCR verläuft in zwei Schritten. Der erste Schritt ist eine normale PCR mit einem Vorwärts-Primern und einem Rückwärts-Primer und dem jeweiligen Template. Bei dem Primerdesign ist darauf zu achten, dass der Rückwärts-Primer von Template 1 und Vorwärts-Primer von Template 2 eine überlappende Sequenz aufweisen. Im zweiten Schritt werden die PCR-Produkte und jeweils der Vorwärts-Primer von Template 1 und der Rückwärts-Primer von Template 2 verwendet. Die Fusion der PCR-Fragmente aus dem ersten Schritt erfolgte an der Stelle, an der die Primer eine überlappende Sequenz aufweisen. Nach erfolgreicher PCR bekommt man ein fusioniertes DNS-Fragment. Um zu verhindern, dass im zweiten Schritt der Wildtyp amplifiziert wird, kann nach dem ersten Schritt ein DpnI-Verdau vorgenommen werden. DpnI schneidet nur methylierte Wildtyp - DNS. Daher ist gewährleistet, dass nur die Templates hydrolysiert werden.

Tabelle 4: Standard PCR- Ansatz

Komponente	Volumen in $\mu\text{l}$
10x PCR Puffer (enthält 15 mM $\text{MgCl}_2$ )	5,0 $\mu\text{l}$
10 mM dNTP	1,0 $\mu\text{l}$
Vorwärts-Primer [10 pmol]	5,0 $\mu\text{l}$
Rückwärts-Primer [10 pmol]	5,0 $\mu\text{l}$
DMSO	2,5 $\mu\text{l}$
DNS Vorlage [100 -200 ng]	X
Dynazyme (Polymerase)	1,5 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$	ad 50 $\mu\text{l}$

Tabelle 5: Standard PCR-Programm für Dynazym- Polymerase

	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	
Denaturierung	30 sec	94 °C	} x25
Annealing	40 sec	55 °C	
Elongation	1:30 min	72 °C	
Abschließende Elongation	2 min	72 °C	
Stabilisation	halten	4 °C	

Tabelle 6: Standard PCR- Programm für Pfu- Polymerase

	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	30 sec	98 °C	
Denaturierung	10 sec	98 °C	} x25
Annealing	40 sec	55 °C	
Elongation	1:20 min	72 °C	
Abschließende Elongation	3 min	72 °C	
Stabilisation	halten	4 °C	

Die RT-PCR (reverse transkriptase PCR) ist eine weitere Form der PCR. Hierbei wird erst die mRNA aus dem entsprechenden Gewebe oder Zellmaterial isoliert. Als Primer für diese PCR werden Hexamere verwendet, die mit der RNS für 10 min bei 70°C inkubiert werden. Nach dieser Inkubation werden dNTPs, DTT und die Superscript II RT Polymerase zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 50 min bei 42°C. Eine Inaktivierung des Enzyms wird durch eine 10 minütige Inkubation von 70°C gewährleistet. Anschließend erfolgt mit der erhaltenen cDNS eine Standard-PCR (siehe Tabelle 7 und 8).

Tabelle 7: RT-PCR-und PCR Ansatz

RT-PCR	
Komponente	Volumen in µl
RNS	10,0 µl
Hexamere	0,5 µl
Sedimentation	
10 min 70 °C Inkubation	
5x Reaktionspuffer	5,0 µl
2 mM dNTPs	6,0 µl
0,1 M DTT	2,5 µl
Superscript II RT	1,0 µl
Sedimentation	
50 min 42 °C Inkubation	
Sedimentation	
10 min 70 °C Inkubation	

PCR	
Komponente	Volumen in µl
Wasser	13,75 µl
10xPCR-Puffer	2,50 µl
Primer for	2,50 µl
Primer rev	2,50 µl
dNTPs (2mM)	2,50 µl
Tag Gold	0,15 µl
cDNS	1,00 µl
	25,00 µl

Tabelle 8: RT- PCR-Programm

	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	10 min	94 °C	
Denaturierung	40 sec	94 °C	
Annealing	40 sec	55 °C	x29
Elongation	40 sec	72 °C	
Abschließende Elongation	5 min	72 °C	
Stabilisation	halten	4 °C	

### 3.3.7. PCR Purification- Kits

Das Purification-Kit von PeqLab (PeqGold Cycle Pure Kit) wurde zum Reinigen von PCR- und Restriktionsansätzen verwendet, welche der Entfernung von Enzymen, Puffern (die für die jeweilige Reaktion von erforderlich waren) und speziell bei der PCR, zur Entfernung der dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphat), sowie des DMSO dient. Die sogenannte Umpufferung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Je nach Bedarf wurde die DNS durch Zugabe von 30 µl EB-Puffer oder RNase freiem Wasser von der Säule eluiert.

### 3.3.8. DNS-Restriktion

Restriktionsenzyme stammen ursprünglich aus Bakterienstämmen, die sich vor einer Infektion mit Bakteriophagen schützen. Dabei kann entweder ein glattes (*blunt end*) oder ein überhängendes Ende (*sticky end*) erzeugt werden. Dies erfolgt in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms. Durch diese Eigenschaft der Enzyme ist es möglich, das Plasmid zu linearisieren oder gezielt bestimmte DNS-Sequenzen in ein zirkuläres Plasmid einzufügen.

Bei der analytischen Restriktion oder analytischen Hydrolyse wird überprüft ob der Vektor das richtige Insert enthält. Dazu wurden ca. 500 ng DNS eingesetzt und mit 10 U Restriktionsendonuklease sowie dem green-fastdigest Puffer (Fermentas) versetzt. Die Inkubation des 10 µl Ansatzes erfolgte bei 37°C für 30 min.

Bei der präparativen Restriktion wurden ca. 1-3 µg DNS eingesetzt. Die DNS wurde mit 20 – 40 Units der entsprechenden Restiktionsendonukleasen, sowie

mit dem fastdigest Puffer (Fermentas) versetzt und bei 37°C über Nacht hydrolysiert.

Die Enzyme wurden je nach Angaben des Herstellers deaktiviert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Ansatzes mit dem PeqGold Cycle-Pure Kit (PCR-Purifikation). Wurde ein Doppelverdau durchgeführt, um ein Insert aus dem Vektor herauszuschneiden, wurde der gesamte Ansatz auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen. Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und eine Gel-Extraktion erfolgte mit dem PeqGold Gel Extraktionskit. Die DNS wurde direkt weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

### 3.3.9. DNS-Ligation

Für die Ligation von DNS-Fragmenten wurde die T4-Ligase von Fermentas verwendet. Der Ligationsansatz wurde auf 10 µl Gesamtvolumen konzipiert, wobei das Insert – Vektor - Verhältnis 1:3 betrug. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h oder über Nacht bei 4°C.

Tabelle 9: Standard Ligationsansatz

Ligationsansatz	
Komponenten	Menge
Insert	6 µl
Vektor	2 µl
10x T4-Ligasepuffer	1µl
T4 Ligase	1µl
Gesamtvolumen	10 µl

### 3.3.10. DNS-Gelelektrophorese

Die DNS/RNS wurde über ein 1% Agarosegel, das GelRed enthielt, bei 85 V und 400 mA für 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1xTAE (Tris-Acetat-EDTA Puffer) benutzt. Die Analyse der DNS/RNS erfolgte mit einem UV-Transilluminator von MW Biotec bei 304 nm. Zur Größenbestimmung der DNS/RNS wurde ein Längenstandard von Fermentas eingesetzt.

### 3.3.11. DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Sequence Laboratories Göttingen GmbH (SEQLAB) durchgeführt. Für jede Sequenzierung wurde eine DNS-Menge zwischen 0,5 µg und 1 µg verwendet. Des Weiteren wurden 2 µl Primer (10 pmol) zugeführt und mit H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> auf 15 µl aufgefüllt. Die Primer hatten eine Länge von 18 bis 30 Nukleotiden und eine Schmelztemperatur von 52°C – 60 °C. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit computergestützten Programmen.

### 3.3.12. cRNS -Synthese

Für die elektrophysiologischen Studien in *Xenopus laevis* Oozyten wurde cRNS der kodierenden Sequenzen der entsprechenden Proteine benötigt. Vor der cRNS -Synthese musste der Oozyten-Expressionsvektor pSGEM mit dem entsprechenden Gen linearisiert werden. Dazu erfolgt ein mindestens zweistündiger Restriktionsverdau mit NHE I bei 37°C. Nach der Aufreinigung mit dem PeqGold Cycle Pure Kit wurde die cRNS -Synthese durchgeführt. Hierfür wurde das mMachine® Kit von Applied Biosystems verwendet.

Tabelle 10: Protokoll zur Herstellung von cRNS

<b>Ansatz für In-vitro-Transkription</b>	
Komponente	Menge
2x NTP-Cap	7,5 µl
10x Reaktionspuffer	1,5 µl
DNS (linearisierter Vektor)	4,5 µl
Enzym-Mix	1,5 µl
Gesamtvolumen	15,0 µl

Die *in-vitro*-Transkription der cRNS erfolgte für 2h bei 37°C. Um die Reinheit der Zur cRNS zu überprüfen, wurde 1 µl des Ansatzes auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Im darauf folgenden Schritt wurde die Fällung der RNS mit 19 µl LiCl-Lösung und 23 µl RNase freien H<sub>2</sub>O durchgeführt. Der Ansatz wurde dann bei -20 °C für 30 min oder über Nacht gelagert. Die

anschließende 30-minütige Zentrifugation wurde bei 13.300 rpm durchgeführt. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 150 µl 80% Ethanol gewaschen. Zur Entfernung des Ethanols wurde eine finale 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm durchgeführt. Nach Entnahme des Überstandes wurde das Pellet bei RT für 5 min getrocknet und anschließend mit 20 µl RNase freien H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

### **3.4. Methoden der Elektrophysiologie**

#### **3.4.1. Injektion von cRNS in *Xenopus laevis* Oozyten**

Um den K<sub>2</sub>P-Kanal TASK-1 und seine Interaktionspartner physiologisch zu untersuchen, wurde die cRNS des Kanals und die der Interaktionspartner in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Aus diesem Grund wurden Oozyten für die elektrophysiologischen Studien sowie die Oberflächenexpressionsstudien des K<sub>2</sub>P-Kanals und seine Interaktionspartner verwendet. Für die Injektion wurden Glasmikropipetten verwendet, die einen Außendurchmesser von 8-12 µm hatten. Die Glaskapillaren von Drummond Scientific wurden mit Hilfe des Mikropipettenpullers (Zeitz) auf den entsprechenden Außendurchmesser gezogen und mit Hilfe eines Binoculars überprüft. Die cRNS von TASK-1 und seiner Interaktionspartner wurden mit Hilfe des In-vitro-Transkriptions-Kit hergestellt. Um die cRNS in die Oozyten zu injizieren, wurde eine mit RNase freiem Öl gefüllte Glasmikropipette am Mikromanipulator angebracht. Das Öl verhindert dabei die Bildung von Luftblasen beim Aufsaugen der RNS. Mit Hilfe des Nanoinject von Drummond Scientific wurden 50,4 nl der aufgesogenen RNS in eine Oozyte injiziert. Um die benötigte cRNS -Menge zu ermitteln, wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Nach der Injektion wurden die Oozyten für 48 h bei 18°C in 2,5 ml ND96-Aufbewahrungslösung inkubiert. Die 48 stündige Inkubation ist nötig, um den Oozyten genügend Zeit für die Synthese der Ionenkanäle und den Transport der Kanäle zur Plasmamembran zu ermöglichen. Für jeden Versuch wurden jeweils 3 Injektionen an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

### 3.4.2. Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Messungen

Um festzustellen, wie viele Kanäle sich auf der Oberfläche der Oozyten präsentieren, wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen Messung (Two-Electrode-Voltage Clamp TEVC) verwendet. Bei dieser Methode wird der Umstand genutzt, dass die Oozyten des *Xenopus laevis* nur sehr wenig eigene Ionenkanäle (heterolog exprimierten Kanälen und auch einige endogen exprimierten Kanäle) auf der Oberfläche besitzen. Durch die injizierte cRNS wird dann der zu untersuchende Kanal von der Oozyte im Überschuss produziert. Des Weiteren steht der zu messende Strom ( $\mu\text{A}$ ) im direkten Zusammenhang mit der Anzahl der Kanäle auf der Oberfläche sowie mit der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle. Um mit dieser Methode die Kaliumleitfähigkeit zu bestimmen, wurde an ein Perfusionssystem mit Perfusionskammer zwei Messelektroden mit Verstärker, ein Analog/Digital Wandler und ein PC mit entsprechenden Auswertungsprogrammen angeschlossen. Um zu Überprüfen, ob man mit den 3 M KCL gefüllten Messelektroden aus Glas, die Oozyten leicht angestochen hat, wurde die Perfusionskammer unter einem Mikroskop platziert. Am Ende der Perfusionskammer waren zwei Referenzelektroden angebracht. Die für die Messung ausgewählten Oozyten wurden in die Perfusionskammer überführt und mit 1x ND 96 Lösung (pH 7,4) perfundiert. Vor dem Anstechen der Oozyten wurde der Widerstand der Messelektroden überprüft. Dieser sollte sich zwischen 0,5 -1,3 M $\Omega$  befinden. Falls das nicht der Fall war, wurden die Spitzen ausgetauscht. Um die Messwerte vergleichen zu können, wurde jedes Ei mit derselben Spannungsrampe gemessen (Abb. 3.4.2.1). Das Haltepotential wurde auf -80 mV geklemmt. Wie in Abbildung 3.4.2.1 dargestellt, wird der Stromfluss, der nötig ist, um die vorgegebene Spannung zu halten, über die Zeit gemessen. Bei TASK-1 wurde die Auswertung bei 0 mV vorgenommen. Um die Messwerte nicht zu verfälschen, wurden nur Eier zur Messung verwendet, dessen Leckstrom eine maximale Abweichung von -0,2 pA nicht überstieg. Die Messungen wurden 3-mal an drei unterschiedlichen Tagen wiederholt.



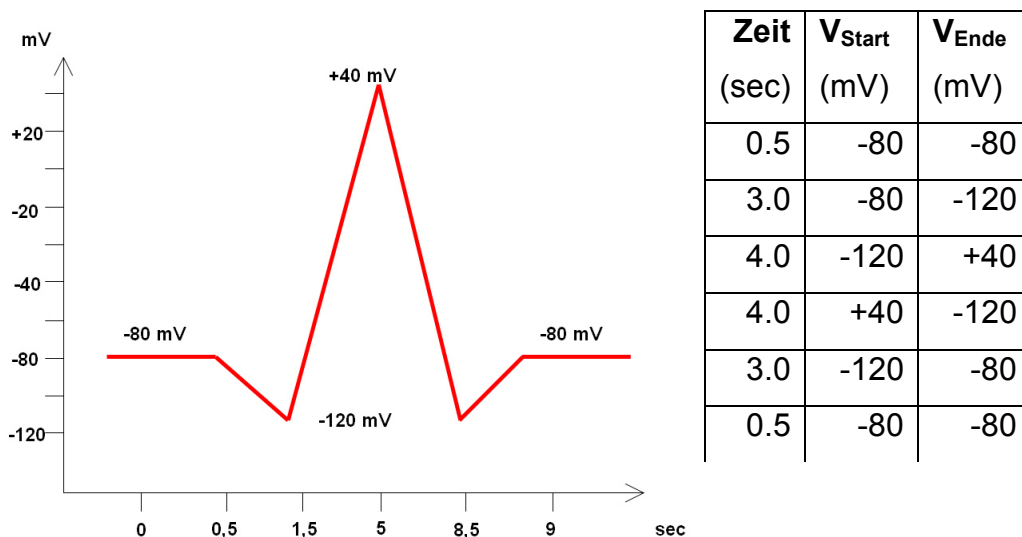


Abbildung 3.4.2.1: Spannungsprotokoll zur Strommessung: Verlauf der Spannungsrampe  
Das Potenzial wurde von -80 mV auf -120 mV gesenkt, dann auf +40 mV erhöht und schließlich wieder auf -80 mV geklemmt. Die Dauer der Rampen liegt ca. bei 10 s.

### 3.5. Oberflächenassay

Mithilfe des Oberflächenassays wird untersucht, ob der beobachtete Effekt aus der Strommessung ein traffic oder ein gateway Effekt ist. Bei dieser Methode wurde rTASK-1-HA verwendet, welcher einen HA-Tag enthält. Der HA-Tag ist ein Oberflächenepitop aus dem Protein *Human influenza hemagglutinin* und enthält die Aminosäuren YPYDVPDYA. Der HA-Tag wurde an Position 225 inseriert und liegt somit in der zweiten Transmembrandomäne. Sobald die entsprechenden cRNS in die Oozyten injiziert wurden, kommt es zur Translation des Kanals und dessen Präsentation an der Zelloberfläche. Nach zwei Tagen Inkubation bei 18 °C konnte mit dem Oberflächenassay begonnen werden. Die Oozyten wurden für 30 min bei 4 °C in 1%-igen BSA/ND96 Lösung geblockt und anschließend wurde der erste Antikörper gegen das HA-Epitop verwendet. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte für eine Stunde bei 4 °C. Bevor der zweite Antikörper verwendet werden konnte, wurden die Eier für 30 min in einer 24 well-Platte gewaschen. Nach je fünf Minuten wurden die Oozyten in das nächste Well überführt. Anschließend wurde ein Peroxidasegekoppelter Zweitantikörper verwendet, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist. Die Inkubation erfolgte für 1h bei 4 °C. Nach dieser Inkubation wurden die Oozyten 1h in einer 24 well-Platte gewaschen, wobei die Oozyten alle 5 min in ein neues Well überführt wurden. Der finale Waschschrift erfolgte in ND96-

Lösung für 15 min. Mit Hilfe der Peroxidase wird ein Substrat umgesetzt, dass 2h vor Gebrauch angesetzt wurde. Die dabei entstehende Chemo-Lumineszenz wurde dann mit einem Luminometer als RLU/s (relative Lichteinheit pro Sekunde) gemessen (Abb. 3.5.1).

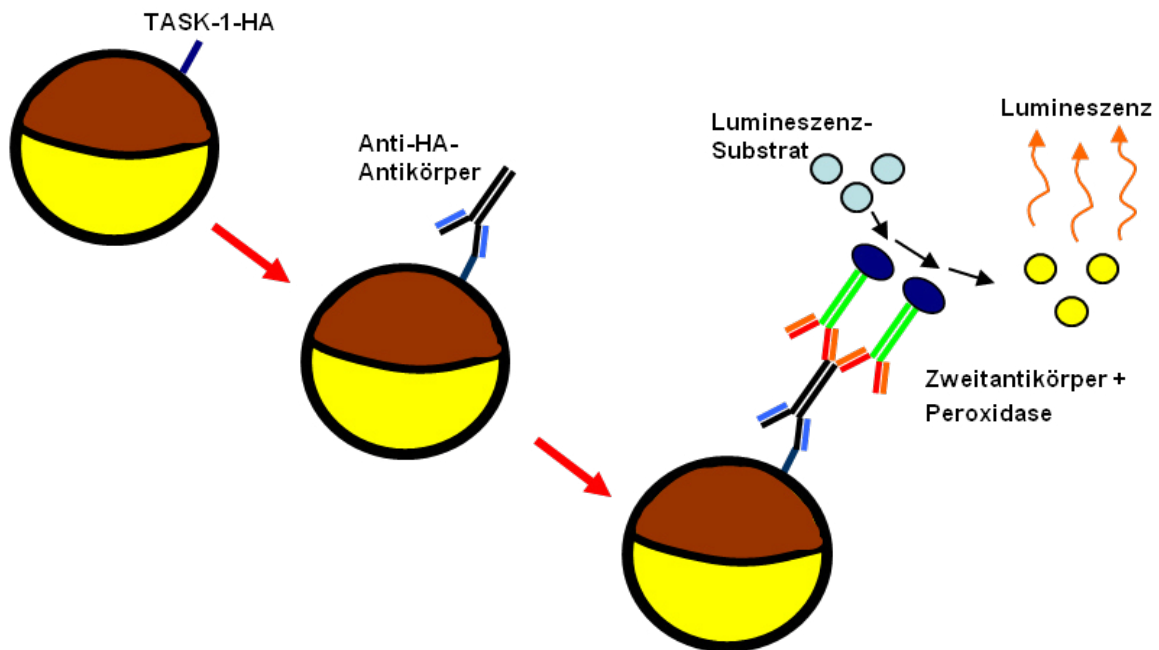


Abbildung 3.5.1: Schematische Darstellung des Oberflächenassays  
TASK-1-HA wird mit Anti-HA-Antikörper markiert. Durch den Zweitantikörper mit gekoppelter HRP binden an die Erstantikörper und verstärken das Signal.

Alle Schritte im Oberflächenassay, bis auf das Messen der Lumineszenz, erfolgten bei 4°C.

### 3.6. Zellkultur

Um bakterielle Kontamination bei Mammalian-Zellkulturen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten in einem separaten Zellkulturlabor durchgeführt. Es wurde ausschließlich mit Hela, A549, Cos7 und PC12 – Zellen gearbeitet.

#### Kulturbedingungen

Bevor mit der zellbiologischen Arbeit begonnen werden konnte, wurde die Sterilbank mit Terralin desinfiziert. Des Weiteren wurden die Zellkulturen auf Kontamination mit Bakterien und Pilzen mikroskopisch untersucht. Im gleichen Schritt wurde auch überprüft, dass keine Vermischung der Zelllinien

stattgefunden hat. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Inkubator bei wasserdampfgesättigten, 5 % CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre und 37°C. Die COS7 Zellen, A549 Zellen sowie die Hela-Zellen wurden in DMEM-Medium und 5 % FCS kultiviert. Die Kultivierung der PC12 Zellen erfolgte in RPMI-Medium mit 5 % FCS und 10 % Horse Serum. Das Kulturmedium wurde zwei bis dreimal pro Woche gewechselt. Dazu wurde das alte Medium abgezogen und durch neues, vorgewärmtes Medium ersetzt (kleine Kulturflasche: 5 ml; große Kulturflasche: 15 ml). Wenn die adhärent wachsenden Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurden sie subkultiviert

### **Subkultivierung adhärent wachsender Zellen**

Die Subkultivierung dient dazu adhärent wachsenden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. In diesem Zellstadium ist die Vitalität und die Fähigkeit DNS aufzunehmen am größten. Um Zellen zu subkultivieren, wurde als erstes das Medium entfernt und die Zellen mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Die Waschschriffe dienten zur Entfernung des FCS, welches die Funktionsweise von Trypsin nachhaltig beeinflusst. Nach Abzug des PBS wurde bei HeLa-Zellen, die in einer 25cm<sup>2</sup> Flasche kultiviert wurden, 1 ml Trypsin/EDTA-Arbeitslösung und bei A549, PC12 und COS7 Zellen 3 ml Trypsin/EDTA-Arbeitslösung hinzugegeben und auf der Oberfläche verteilt. Die Inkubation erfolgte je nach Zelllinie für ca. 1-5 min bei 37°C. Die Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Durch vorsichtiges Aufklopfen wurde das Ablösen der Zellen unterstützt. Zum Abstoppen der Aktivität des Trypsins wurden 5 ml Kulturmedium hinzu gegeben. Die so aufgenommenen Zellen wurden bei Raumtemperatur für 2 min bei 1500 x g sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml Kulturlösung aufgenommen, resuspendiert und je nach Versuchsparametern ein bestimmter Anteil der Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt.

### **Transfektion von Zellen**

Für die Transfektion von COS7 und HeLa-Zellen wurde das Reagenz JetPrime verwendet. Hierbei wurden je nach Größe des Kulturgefäßes die Menge der eingesetzten DNS variiert. Bei Kulturschalen bis zu einem Durchmesser von 15mm wurden 1 µg DNS und 200 µl JetPrime-Puffer eingesetzt. Bei Kulturschalen bis zu einem Durchmesser von 30 mm wurden 5 µg DNS und

500 µl JetPrime-Puffer eingesetzt. Es wurde immer, bezogen auf die eingesetzte DNS, die doppelte Menge des Transfektionsreagenz JetPrime verwendet. Die DNS wurde in dem JetPrime-Puffer resuspendiert und für 10 sec gut gemischt. Im zweiten Schritt wurde die entsprechende Menge von JetPrime Transfektionsreagenz hinzugegeben und erneut für 10 sec gut gemischt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 10 min bei RT. Anschließend wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

### **3.7. Methode der Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden HeLa Zellen mit JetPrime transfiziert. Für die Betrachtung der fluoreszierenden Zellen nach 24h und 48h wurde das Olympus IX71 Fluoreszenzmikroskop und ein 100 x Ölimmersionsobjektiv (100x PLAPO 100x 03 N.A. 1.4 WD 0,10 mm) verwendet. Die Bilder wurden mit einer an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen 12bit SensiCam QE (PCO) aufgenommen. Für die Betrachtung von Zellen, die mit GFP, DsRed oder pmCherry-Fusionsproteinen transfiziert wurden, wurden folgende Filter verwendet: EGFP (Exciter: HQ 470/40, Beamsplitter: Q 495 LP, Emitter: CG420) DsRed oder pmCherry

Texas Red (Exciter: HQ 560/740, Beamsplitter: Q595 DCLP, Emitter: HQ 630/60) UV (Exciter: HQ 369/50, Beamsplitter : 400 DCLP, Emitter: GG420). Für die Auswertung der Bilder wurde die Software Image-Pro<sup>®</sup> Plus 4.5 (Mediacybernetics) verwendet.

### **3.8. Antikörper Aufnahme Assay**

Der Antikörper Aufnahme Assay ist eine Methode um den Vorgang der Endozytose zu untersuchen. Hierbei wird untersucht, inwiefern Membranproteine in einer bestimmten Zeit endozytiert werden. Dabei werden die Membranproteine mit einem Erstantikörper markiert. Nach dieser Markierung werden die Zellen für eine definierte Zeit bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wird eine bestimmte Menge des markierten Membranproteins zusammen mit dem Antikörper endozytiert. Im darauf folgenden Schritt wird ein

grün/rot fluoreszierender Zweitantikörper verwendet, um die membranständigen Erstantikörper zu markieren. Nach permeabilisieren der Membran wird ein weiterer rot/grün fluoreszierender Zweitantikörper genutzt, der nun an die endozytierten, mit Erstantikörper verbundenen Proteine zu binden kann (A 3.6.3.2.1).

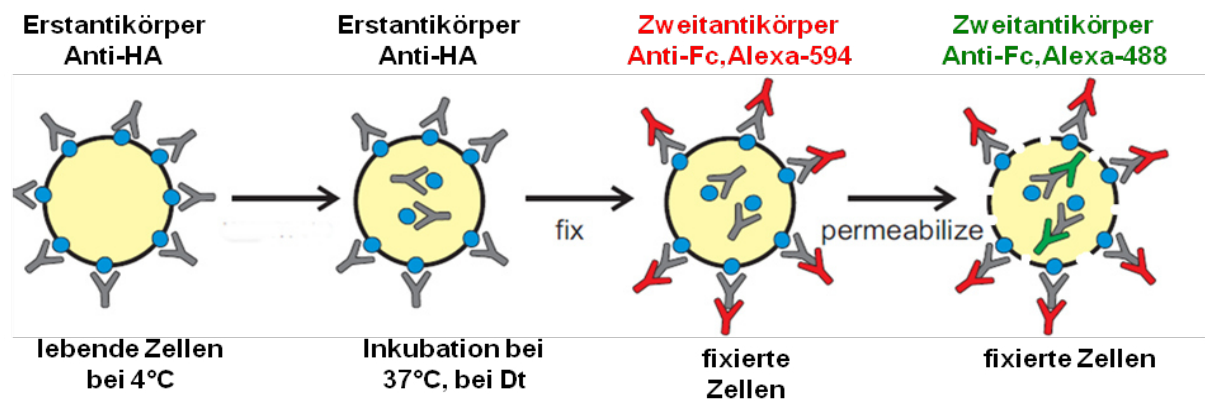


Abbildung 3.8.1: Ablauf des Antikörper Aufnahme Assays. (V. Renigunta et.al., 2014)

Bevor der Versuch gestartet werden konnte, wurden Deckgläschen zum Anrauen der Oberfläche zwei Tage zuvor für 1 h in 1mM HCl inkubiert, um eine Anrauerung zu gewährleisten. Im zweiten Schritt wurden die Deckgläschen für 1h in 70 % (v/v) Ethanol inkubiert und in 6 well-Platten in der Sterilbank unter UV-Licht getrocknet. Nachdem die Deckgläschen trocken waren, wurden sie einmal mit PBS (pH 7,4) gespült. Anschließend konnten die entsprechenden Zellen aufgebracht werden. Die Inkubation erfolgte unter Standardkulturbedingung. 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert.

Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden für 30 min mit 5% (v/v) FCS/PBS bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Im Anschluss wurden die Ansätze mit dem ersten Antikörper (1:1000) für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgten 2 zweiminütige Waschschrte mit 5 % (v/v) FCS/PBS (pH 7,4). Im darauffolgenden Schritt wurden, pro transfiziertem Konstrukt, die Zellen des einen Wells 0 min und die des anderen Wells 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Fixierung der Zellen für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung. Nach dieser Inkubation, wurden die Zellen mit dem zweiten Antikörper (1:500) Alexa 594 für 1 h 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 zweiminütigen Waschschrte mit PBS (pH

7,4) durchgeführt. Die Permeabilisierung der Membranen erfolgte mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 10 min bei 4 °C. Nach 2 zweiminütige Waschschritten mit PBS (pH 7,4) konnten die Zellen mit dem Zweitantikörper Alexa 488 (1:6000) für 30 min auf Eis inkubiert werden. Die Zellen wurden dreimal mit PBS (pH 7,4) für je 5 min gewaschen. Die bewachsenen Deckgläschen wurden dann mit Moviol 4-88 überschichtet und auf Objektträger überführt. Das Trocknen erfolgte über Nacht im Dunkeln. Zur Fixierung der Deckgläschen auf den Objektträgern wurden die Ränder der Deckgläschen mit durchsichtigem Nagellack bestrichen. Nachdem der Nagellack getrocknet war, wurden die Zellen unter dem Olympus IX71 Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Um nun eine quantitative Aussage über die Rate der Endozytose zu treffen, wurde die Lichtintensität der roten und grünen Antikörper mit dem Programm NIS-Elements AR Analysis 4.00.05 gemessen. Bei jeder Messung wurde pro Transfektionsansatz der Hintergrund von den Signalen der rot und grün fluoreszierenden Antikörper abgezogen. Um alle Kanäle, die die Zelle exprimierte zu berücksichtigen, wurden im folgenden Schritt die Mittelwerte der Intensitäten der rot fluoreszierenden Antikörper (entsprechend der Kanäle, die sich an der Zellmembran befinden) und die Mittelwerte der Intensitäten der grün fluoreszierenden Antikörper (entsprechend der Kanäle die endozytiert wurden), summiert und auf 100% gesetzt. Im darauf folgenden Schritt wurden die roten Signale sowie die grünen Signale in Relation zu den 100% gesetzt.

### **3.9. Proteinbiochemie**

#### **3.9.1. Proteinexpression in *E.coli* BL21**

*E.coli* BL21 wurden mit dem Vektor pGEX4T-1, der zusätzlich die codierenden Sequenzen des Wunschproteins enthielt, transformiert, auf einer LB Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Agarplatte wurde ein Klon entnommen und in 2 ml 2xYT Medium mit Ampicillin überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Mit Hilfe dieser Vorkultur wurde am darauffolgenden Tag 50 ml frischem 2xYT-Medium mit Ampicillin angeimpft. Zu beachten war, dass die optische Dichte (OD) einen Wert von 0,2 hatte. Die Inkubation der Flüssigkultur erfolgt bei 37°C bis eine OD von 0,6

erreicht war. Sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,6 erreicht hatte, wurde 1  $\mu$ M IPTG zugegeben. Dabei wurde eine Endkonzentration von 1  $\mu$ M eingestellt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Nach Zentrifugation bei 5300rpm für 10 min und dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml 1 x PBS resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese Zellen viermal für 40 sec auf Eis mit Ultraschall behandelt. Nach der Ultraschallbehandlung wurden dem Ansatz 100  $\mu$ l Triton X-100 zugegeben und dieser für 30 Minuten schüttelnd bei 4°C inkubiert. Die Pelletierung erfolgte für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

### **3.9.2. Proteinexpression in HeLa**

48 h nach Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht haben. Wenn das der Fall war, wurde das Medium entfernt und die Schalen einmalig mit 5 ml 1xPBS gewaschen. Bevor die Zellen geerntet werden konnten, wurde 1 ml 1x PBS auf die Zellen gegeben und der Ansatz auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber geerntet und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zum Sedimentieren wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C und bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Resuspendierung der Pellets erfolgte in 500 - 1000  $\mu$ l Triton X-100 Lysepuffer (dabei wurde der Protease Inhibitor- Cocktail kurz zuvor dazugegeben). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4°C. Zur Pelletierung wurde eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 und 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

### **3.9.3. Pull-down-Assay**

Bei einem Pull down sind die direkten Interaktionen zwischen Proteinen nachweisbar. Dabei werden Proteine oder Proteinsequenzen entweder mit einem Tag z. B. 6 Histidine (His-Tag) oder einer Glutathion-Sepharose-Transferase (GST-Tag), fusioniert. Sobald man mit Hilfe von Histidine bindig-Beads oder Glutathion-Sepharose-Beads, die an den Tag binden, die

Fusionsproteine aus der Proteinlösung entfernt, wird gleichzeitig der jeweilige Interaktionspartner präzipitiert.

#### **3.9.4. GST-Pull down**

Bei einem GST-Pull down werden die GST-Fusionsproteine in Bakterien hergestellt. Nachdem man die Fusionsproteine mit den Beads aufgereinigt hat, wird eine weitere Proteinlösung benötigt, die das Interaktionspartnerprotein enthält. Von dem, bei 4°C in Ethanol, gelagerten Beads wurden 200 µl entnommen und mit 1 ml kalten 1x PBS gewaschen. Der Ansatz wurde für 3 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads durch Zugabe von 1 ml 1x PBS erneut gewaschen. Die Pelletierung erfolgte für 3 min bei 2500 rpm. Der Überstand wurde verworfen. Die Sepharose Beads wurden in 150 µl kaltem 1x PBS aufgenommen und direkt in die Proteinlösung gegeben. Die Inkubation erfolgte 4-6h bei 4°C. Das Sedimentieren erfolgte für 3 min bei 3000 rpm. 100µl Überstand (Sup) wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl 5x SDS Auftragspuffer versehen. Der Ansatz wurde für 10 min bei 100°C aufgekocht, um die Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Der Rest des Überstandes wurde verworfen. Die Beads wurden zweimal mit 1ml kalten 1x PBS gewaschen und für 4 min bei 3000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden 150-250 µl des zweiten Proteinlysates dazu gegeben und bei 4°C schwenkend über Nacht inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Beads für 3 min bei 3000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und die Beads dreimal mit 1ml kalten 1 x PBS gewaschen. Die Beads wurden für 3 min bei 3000 rpm sedimentiert und der Überstand erneut verworfen. Die Beads wurden in ca. 100 µl 2x SDS-Auftragspuffer aufgenommen und bei 100°C für 10min aufgekocht. Die Ansätze wurden anschließend auf ein 12% SDS-Gel geladen oder bei -20°C gelagert.



### 3.9.5. His- Pull down

Für den His-Pull down wurden Proteinlysate von HeLa-Zellen verwendet, die das Protein mit dem His-Tag und das Interaktionspartnerprotein enthalten.

Von einer Histidin-bindenden Magnet-Beads-Lösung wurden 50 µl mit kaltem 1 ml 1x PBS gewaschen. Die Beads wurden mit Hilfe eines Magnetes aus der Lösung entfernt. Der Überstand wurde verworfen und die Beads durch Zugabe von 1 ml 1x PBS erneut gewaschen. Die Beads wurden mit Hilfe eines Magnetes aus der Lösung entfernt und der Überstand wurde verworfen. Die Beads wurden direkt in die Proteinlösung gegeben. Die Inkubation erfolgte entweder für 10-30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C. Im nächsten Schritt wurden die Beads mit einem Magneten aus der Proteinlösung entfernt. 100 µl des Überstandes (Sup) wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl 5x SDS Auftragspuffer versehen. Der Ansatz wurde für 10 min bei 100°C aufgekocht, um die Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Der Rest des Überstandes wurde verworfen. Die Beads wurden zweimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Die Beads wurden mit Hilfe eines Magnetes aus der Lösung entfernt, in 30 µl 2x SDS-Auftragspuffer aufgenommen und für 10 min bei 100 °C aufgekocht. Die Ansätze wurden anschließend auf ein 12 % SDS-Gel geladen oder bei -20 °C gelagert.

### 3.9.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine und Proteinlysate genauer zu untersuchen, wurden die Proteine als erstes nach ihrer Größe (Molekulargewicht Angabe in kDa) aufgetrennt. Hierfür wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet. Je nachdem wie hoch die Konzentration des Acrylamids ist, wird eine bessere Auftrennung in unterschiedlichen kDa-Bereichen erreicht siehe Tabelle 11.

Tabelle 11: Angaben zur optimalen Auftrennung von Proteinen in Bezug auf die Acrylamidkonzentration  
<http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/PAGE.pdf>

Acrylamidkonzentration (%)	6	8	10	12	15
Trennbereich (kDa)	50-200	30-95	20-80	12-60	10-43

Die Proben wurden mit dem SDS-Auftragspuffer versetzt und anschließend bei 100 °C für 10 min aufgeköcht. Dieser Puffer sorgte für die Denaturierung der Proben und durch das enthaltene SDS wurden alle Proteine negativ geladen. Damit ist gewährleistet, dass die Proteine nur nach ihren molekularen Massen (kDa) aufgetrennt wurden. Die Zusammensetzung des Trenngels sowie des Sammelgels ist in Tabelle 12 und 13 zusammengefasst.

Tabelle 12: Zusammensetzung des 12%Trenngels  
<http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/PAGE.pdf>

30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	4 ml
H <sub>2</sub> O	2,53 ml
Trenngelpuffer (Tris 1,5 M, pH 8,8)	3,33 ml
SDS (10% w/v)	100 µl
APS (10% w/v)	50 µl
TEMED	10 µl

Tabelle 13: Zusammensetzung des 4%Samelgels  
<http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/PAGE.pdf>

30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	1,33 ml
H <sub>2</sub> O	6,57 ml
Sammelgelpuffer (Tris 1,0 M, pH 6,8)	2 ml
SDS (10% w/v)	100 µl
APS (10% w/v)	100 µl
TEMED	10 µl

Zur Herstellung eines SDS-Gels wurden die Komponenten (siehe Tabelle 12 und 13) in 50 ml Falkons angesetzt. Das TEMED wurde erst kurz vor Gebrauch der Lösung dazugegeben. Als äußere Begrenzung für die Gele wurden zwei Glasplatten verwendet, die in einer Vorrichtung fixiert wurden. Da am Rand an einer der beiden Glasplatten schmale Platzhalter angebracht waren, hatten die Glasplatten einen definierten Abstand zueinander. Nach Zugabe von TEMED und der Komplettierung des Trenngels wurde das Gel im flüssigen Zustand zwischen die Platten gegossen. Um zu verhindern, dass das Gel eine wellige Oberkante bekommt, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach

Aushärten des Gels wurde das Isopropanol abgegossen und mit dem Sammelgel überschichtet. Mit einem Kunststoffkamm wurden Taschen für die Proteinlysate in das Sammelgel eingefügt. Nach dem Aushärten wurde das Gel entweder bei 4 °C in Frischhaltefolie gelagert oder direkt verwendet. Sobald man die Gele in die Apparatur eingespannt hat, entsteht ein Raum, der mit 1 x Elektrodenpuffer versehen wurde. Die Apparatur wurde dann in eine dazugehörige Wanne eingebaut. Diese Wanne wurde ebenfalls mit 1 x Elektrodenpuffer versehen. Eine Spannung von 180 V und 72 mA wurde angelegt, sobald die Gele mit einem Proteinmarker und den vorbereiteten Proben beladen wurden. Die Laufzeit betrug 1h 30 min.

### **3.9.7. Westernblotting**

Zum Nachweis von Proteinen wurden Antikörper verwendet, die nur ein ganz bestimmtes Epitop oder Peptid erkennen. Um die Proteine, die mit einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, mit Antikörpern nachzuweisen, werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer wurde nach den Angaben von BioRad durchgeführt. Es wurden 5 Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran in den Blottingpuffer getränkt. Im nächsten Schritt wurden zwei Filterpapiere in die Blotkammer von BioRAD auf die Anode gelegt. Auf die Filterpapiere wurden das SDS-Gel und drei weitere Filterpapiere sowie die Kathode platziert. Nach dem Verschließen der Kammer wurden eine Spannung von 25 V und eine Stromstärke von 120 mA angelegt. Die Laufzeit betrug 1 h 30 min. Nachdem der Transfer abgeschlossen war, wurde die Membran mit 5% Milch/TBS geblockt. Das Blocken erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Im zweiten Schritt wurde die Membran mit dem ersten Antikörper, der 1:1000 in 5% Milch/TBS verdünnt war, für 1h bei RT oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Auf die Inkubation folgten vier zehnminütige Waschschrte mit TBS. Die Inkubation des zweiten Antikörpers, der 1:10.000 in 5% Milch/TBS verdünnt war, erfolgte für 1h bei RT. Auf die Inkubation folgten 4 zehnminütige Waschschrte mit TBS. Anschließend erfolgte ein Waschgang für 10 min mit TBS plus 0,1% Tween20 (v/v) bei RT. Der finale Waschschrte erfolgte für 10 min mit TBS bei RT.

Der Zweitantikörper eine Peroxidase enthielt, erfolgte ein Umsatz des Substrates und erzeugte eine Chemilumineszenz. Ein Röntgenfilm wurde mit dieser Chemilumineszenz belichtet. Je nachdem wie stark das Signal war, wurde eine längere oder kürzere Belichtungszeit gewählt. Der Röntgenfilm wurde anschließend für je 1 min in Entwicklerlösung (AGFA), Stopplösung (2%ige Essigsäure) und Fixierlösung (AGFA) gebadet. Die Zweitantikörper von Licor sind mit einem IRDye Infrarot Farbstoff markiert und lassen sich mit einem Laser im Infrarot Bereich von 680nm bzw. 800nm anregen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Odyssey Sa von Licor.

### 3.10. Statistische Auswertung

Nach dem Erstellen der Messreihen wurden die Mittelwerte, die Standardabweichungen und der Standardfehler berechnet. In biologischen Systemen ist auch die Signifikanz der Ergebnisse zu berücksichtigen. Um die Signifikanz zu berechnen, wurde der zweiseitige, ungepaarte T-Test verwendet. Zum Überprüfen des signifikanten Unterschiedes, werden jeweils die Mittelwerte zweier Datenreihen miteinander verglichen. Der T-Test gibt einen p-Wert an. Dieser p-Wert beschreibt die Irrtumswahrscheinlichkeit. Demzufolge ist, je kleiner der p-Wert ist, die Signifikanz umso größer und desto kleiner ist die Irrtumswahrscheinlichkeit. Um in den Graphen die Signifikanz und die Unterschiede darzustellen, wurden die Mittelwerte mit einem Stern markiert, dessen p-Wert kleiner 0,05 ist. Mittelwerte, dessen p-Wert kleiner 0,01 ist, wurden mit zwei Sternen markiert. Drei Sterne haben die Messreihen und dessen Mittelwerte erhalten deren p-Wert kleiner 0,001 war.

### Computergestützte Auswertprogramme

Tabelle 14: Folgende Programme wurden zur Auswertung von Sequenzen benutzt

<b>ClustalW2</b> (EMBL-EBI)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2/">www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2/</a>
<b>EMBL</b> (European Molecular Biology Laboratory)	<a href="http://www.embl.de/">www.embl.de/</a>
<b>ExPASy</b> (Expert Protein Analysis System)	<a href="http://www.expasy.ch">www.expasy.ch</a>
<b>NCBI</b> (National Center for Biotechnology Information)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
<b>Web Map Preferences</b>	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu">http://pga.mgh.harvard.edu</a>

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bestimmung der Proteininteraktion im Hefe-Zwei-Hybrid System

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Split-Ubiquitin-Systems von Mobitec wurde eine DNS-Bibliothek nach spezifischen Interaktionspartnern von TASK-1 durchsucht (siehe Abschnitt 3.1.2.1). Mit dieser Methode wurde SCAMP5 als ein neuer Interaktionspartner von TASK-1 identifiziert. Zur Durchführung von weiteren primären Interaktionsstudien an den beteiligten Proteinen wurden die  $K_{2P}$ -Kanäle TASK-1, -3 und -5 in den Ködervektor pBT3N und SCAMP1 und SCAMP2 sowie SCAMP5 in den Beutevektor pPR3N kloniert. Wenn die Hefe beide Plasmide aufnimmt, ist der Organismus in der Lage, auf Minimalmedium-Platten, welche kein Leucin (L) und Tryptophan (W) enthalten, zu wachsen (Transformations-Kontrolle). Tritt eine Interaktion zwischen den Proteinen auf, kann die Hefe auch auf Minimalmedium-Platten wachsen, welche kein Leucin (L), Tryptophan (W), Histidin(H) und Adenin (A) enthalten. Mit Hilfe dieser Methode wurde SCAMP5, jedoch nicht SCAMP1 und SCAMP2 als ein neuer Interaktionspartner von TASK-1 bestätigt (Abb. 4.1.1.A). Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse wurde zusätzlich ein X-Gal-Assay durchgeführt (siehe Absatz 3.1.2.3.1). Dieser Assay bestätigte, dass TASK-1 mit SCAMP5 eine nachweisbare Interaktion aufweist (Abb. 4.1.1.B, Gold 2009).

Es wurden auch die  $K_{2P}$ -Kanäle TASK-3 und TASK-5 mit SCAMP1, SCAMP2 oder SCAMP5 kotransformiert, um die Spezifität der Interaktion von TASK-1 mit SCAMP5 zu untersuchen. Im Unterschied zu TASK-1 konnte jedoch bei TASK-3 und TASK-5 keine signifikante Interaktion mit SCAMP5 gezeigt werden. Auch SCAMP1 und SCAMP2 interagierten nicht mit TASK-3 oder TASK-5 (Abb. 4.1.1.C). Demzufolge ist die Interaktion von SCAMP5 spezifisch für TASK-1. Um eine funktionelle Konsequenz aus der Interaktion von TASK-1 und SCAMP5 zu untersuchen wurden TASK-1 und SCAMP5 in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die TASK-1 Ströme gemessen.

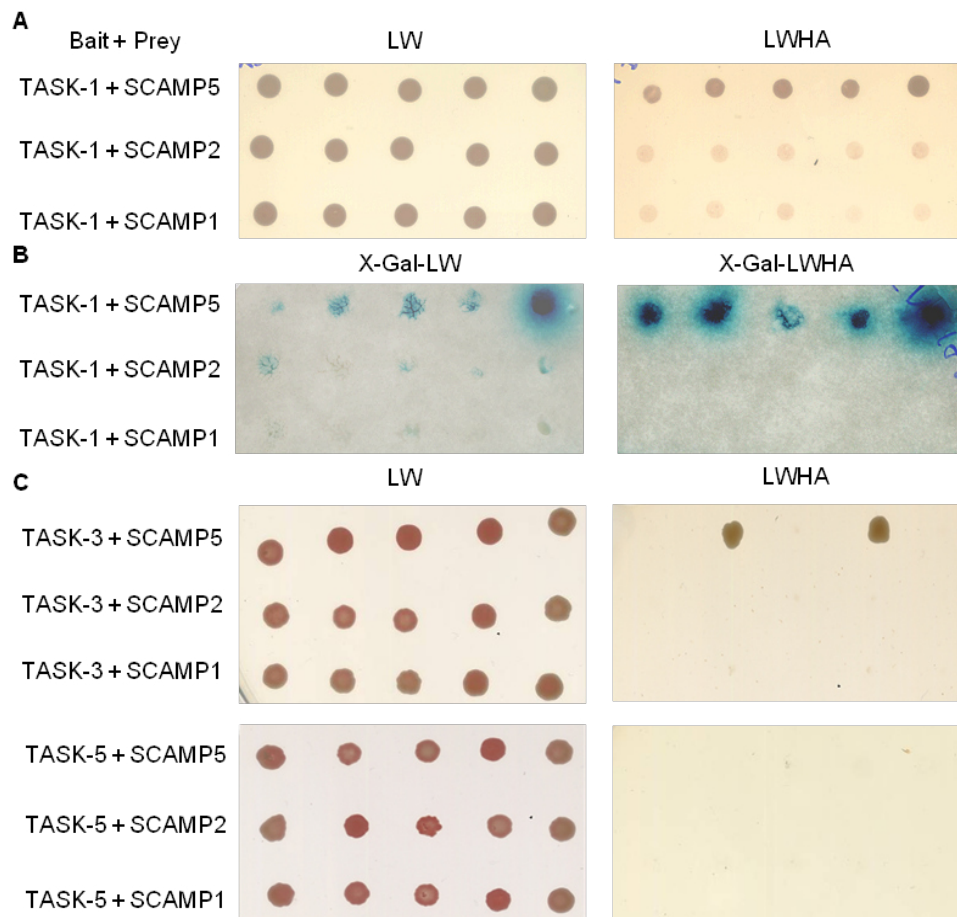


Abbildung 4.1.1: Interaktion von SCAMP1, 2 und 5 mit den  $K_{2P}$ -Kanälen TASK-1, -3 und -5  
 Ein Wachstum der Klone auf SD-LW (Medium ohne Leucin (L) und Tryptophan (W)) garantiert, dass beide Plasmide aufgenommen wurden (Kontrolle). Wächst die Hefe auf SD-LWHA (Medium ohne Leucin (L), Tryptophan (W), Histidin (H) und Adenin (A)) zeigt dies, dass eine starke Interaktion der zwei Proteine stattfindet.

## 4.2. Funktionelle Interaktionsstudien zwischen TASK-1 und SCAMPs

### 4.2.1. Interaktion von SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 mit TASK-1

#### Die Wirkung der SCAMPs auf TASK-1 Strom

Ionenkanäle erzeugen einen Strom ( $I$ ) über die Zellmembran. Der Strom resultiert aus der Öffnungswahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) des Ionenkanals, der Anzahl der Kanäle auf der Plasmamembran ( $N$ ) (Yajuan *et al.* 2012), der Einzelkanalleitfähigkeit ( $\gamma$ ) und der treibenden Kraft ( $E_m - E_x$ );  $E_m$  ist das Membranpotential,  $E_x$  ist das Gleichgewichtspotential des Ions, das durch den

Kanal hindurchtreten kann. Für einen Kaliumstrom gilt:  $I = N P_o \gamma (E_m - E_K)$ .

Nachdem im Hefe-Zwei-Hybrid System bereits eine Interaktion zwischen SCAMP5 und TASK-1 gezeigt wurde (Abb. 4.1.1), wurde nun untersucht, ob die SCAMPs einen Einfluss auf den TASK-1-Strom zeigen. Es wurden 0,75 ng der cRNS von TASK-1 und drei verschiedene Konzentrationen der potentiellen Interaktionspartner SCAMP-1, -2 und -5 in Oozyten injiziert. Die höchste Konzentration führte bei allen SCAMP-Proteinen zu einer signifikanten Verringerung des TASK-1 Stromes. Die Koinjektion von SCAMP1 reduzierte den Strom um ca. 51 %, SCAMP2 um ca. 52,7% und SCAMP5 um ca. 40% (Abb. 4.2.1.1).

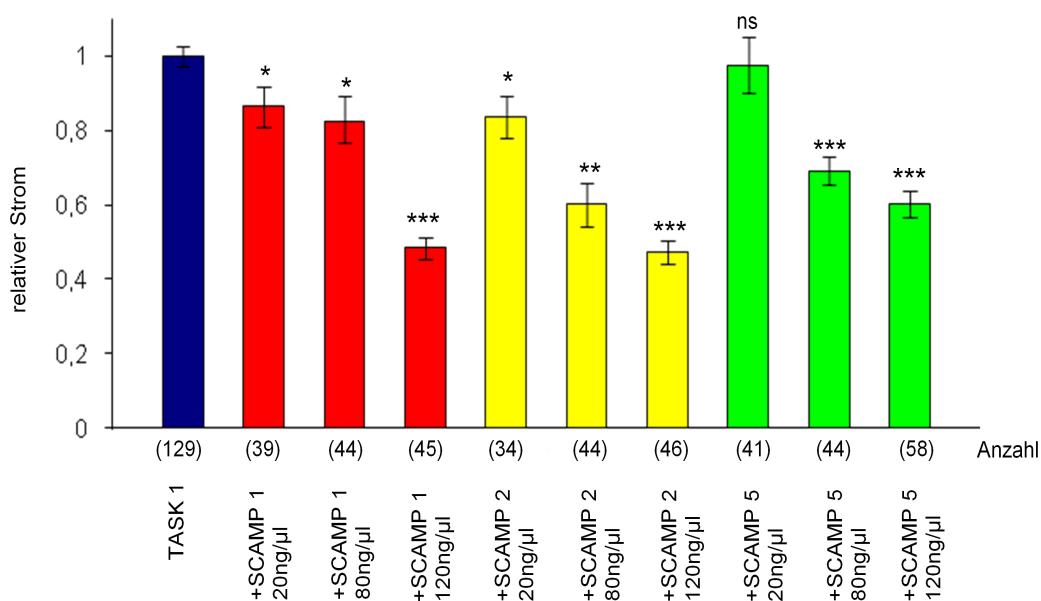


Abbildung 4.2.1.1: Titration des Effekts von SCAMPs auf den TASK-1-Strom  
Koinjektion von SCAMP-cRNS mit einer Konzentration von 20 ng/μl, 80 ng/μl oder 120 ng/μl sowie einer TASK-1-cRNS -Konzentration von 15 ng/μl. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion des TASK-1 Stroms bei einer Koinjektion mit SCAMPs und einer RNS Konzentration von 120 ng/μl.

Dieses Ergebnis war überraschend, da im Hefe-Zwei-Hybrid System lediglich SCAMP5 eine direkte Interaktion mit TASK-1 gezeigt hatte (Abb. 4.1.1). Da bekannt ist, dass SCAMPs miteinander interagieren können (Wu *et al.* 1997), ist der Effekt von SCAMP-1 und -2 auf TASK-1 möglicherweise durch endogenes SCAMP5 vermittelt. Die Sequenzhomologie von *Xenopus laevis* SCAMP5 und des humanem SCAMP5 liegt etwa bei 84,3%. Daher wurden *Xenopus laevis*

Oozyten auf die endogene Expression der SCAMPs untersucht. Mittels semi-quantitativer RT-PCR konnte gezeigt werden, dass *Xenopus laevis* Oozyten sowohl SCAMP1, SCAMP2 als auch SCAMP5 nativ exprimieren (Abb. 4.2.1.2).

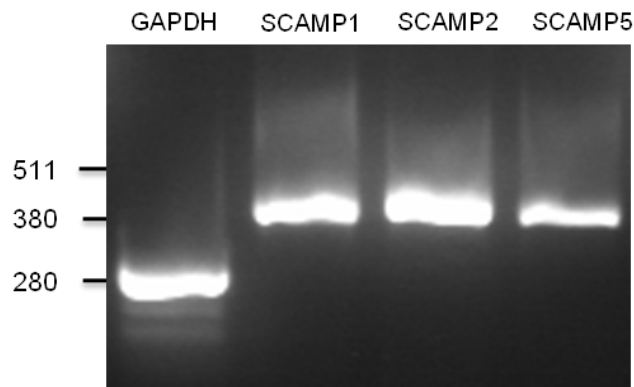


Abbildung 4.2.1.2: RT-PCR von *Xenopus laevis* Oozyten. RNS von Oozyten wurde isoliert und mit RT-PCR auf die Expression von SCAMP - Proteinen untersucht. SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 zeigten eine deutliche Expression. GAPDH diente als Positivkontrolle. Als Marker wurde der  $\Lambda$  DNS/Eco47I (Avall) Marker 13 von Fermentas verwendet.

### Effekt auf TASK-1 Oberflächenexpression

Bei den Strommessungen wurde ein hemmender Effekt bei einer SCAMP cRNS Konzentration von 120 ng/ $\mu$ l festgestellt. Zur genaueren Untersuchung der Ursache dieser Reduktion, wurde mit den gleichen cRNS Konzentrationen die Membranexpression von TASK-1 mittels eines Oberflächenassay an Oozyten analysiert. Mit dieser Methode kann festgestellt werden, ob die Reduzierung der Stromstärke mit einer Verringerung der Anzahl der Kanäle auf der Plasmamembran einhergeht. Es wurde nachgewiesen, dass die Membranexpression von TASK-1 (und damit die Anzahl der Kanäle an der Oberfläche) durch die Koexpression von SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 signifikant reduziert wird (Abb. 4.2.1.3).



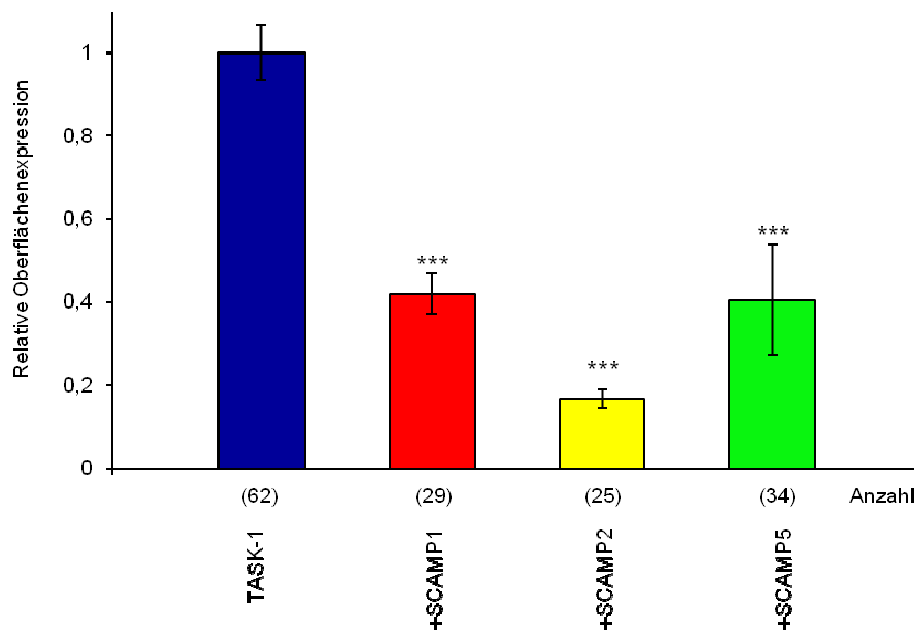


Abbildung 4.2.1.3: Oberflächenexpression von TASK-1

15 ng/μl TASK-1 cRNS wurde mit jeweils 120 ng/μl cRNS von SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression von TASK-1 bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Reduzierung der Anzahl von TASK-1 bei einer Koinjektion mit SCAMPs.

Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion der Stromstärke im Wesentlichen durch eine Verringerung der Anzahl der Kanäle an der Zelloberfläche verursacht wurde.

### Analyse der für die TASK-1-Interaktion verantwortlichen SCAMP-Proteindomänen

Um zu untersuchen, welche Regionen in den Secretory Carrier Membrane Proteinen für die Verringerung der Oberflächenexpression des TASK-1 Kanals verantwortlich sind, wurden verschiedene Deletionsmutanten der SCAMPs hergestellt. Die Konstrukte wurden kloniert (Abb. 4.2.1.4), gemeinsam mit TASK-1 in Oozyten koexprimiert, und der resultierende Strom wurde gemessen.

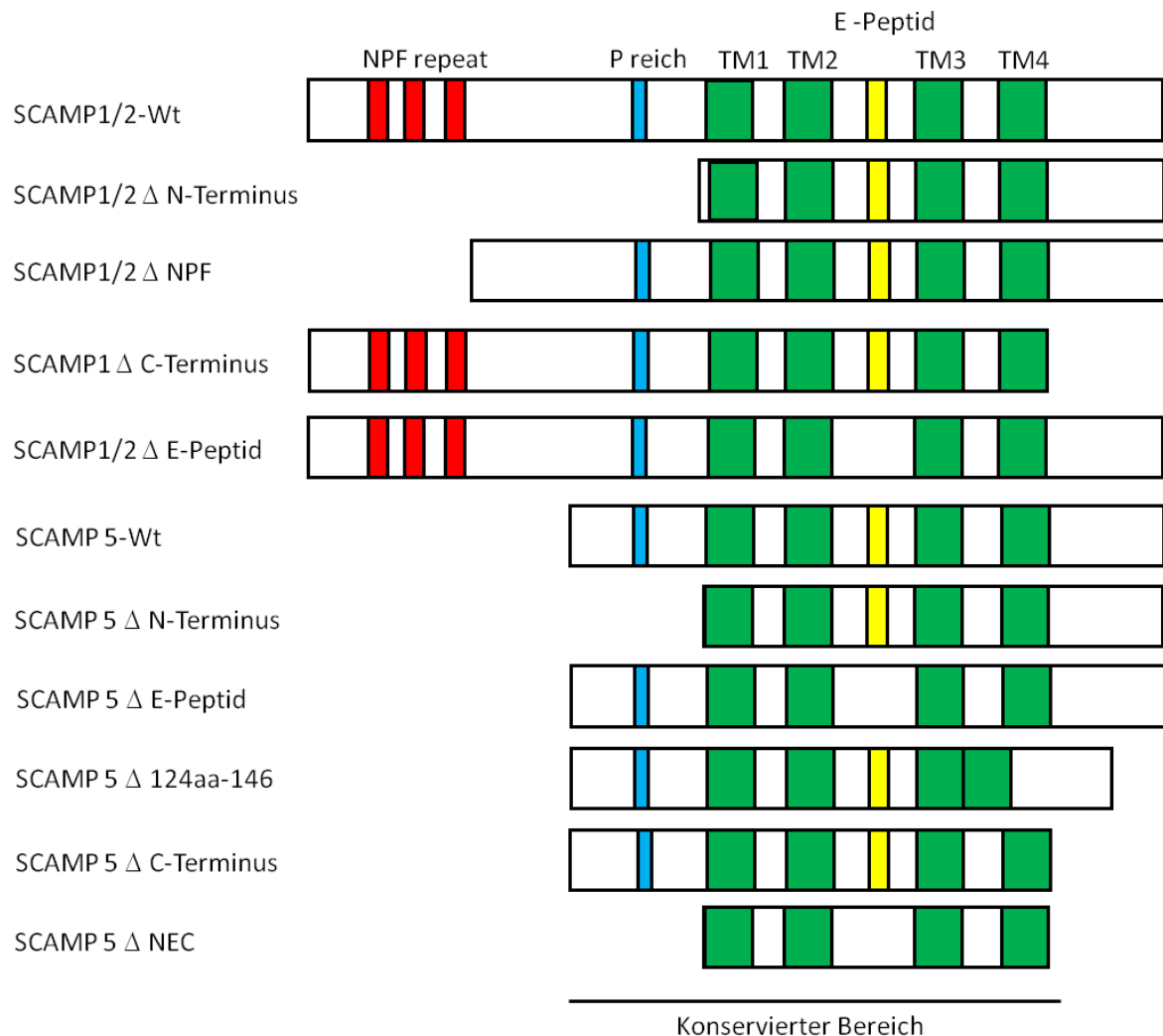


Abbildung 4.2.1.4: Schematische Darstellung der SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 Proteine und deren jeweiligen Mutationen

Die Deletion des C-Terminus von SCAMP1, und 5 und die Deletion des E-Peptides von SCAMP1 und SCAMP2 hatten keinen Einfluss auf die Verringerung der Stromamplitude von TASK-1, d.h. sie spielen wahrscheinlich bei der funktionellen Interaktion keine Rolle. Das E-Peptid befindet sich zwischen der zweiten und der dritten Membrandomäne; es kann an  $\text{PIP}_2$  zu binden (Liao *et al.* 2007). Dahingegen war die Mutante SCAMP1 ΔN-Terminus nicht in der Lage, den Strom von TASK-1 zu reduzieren. Die Mutante SCAMP2 ΔN-Terminus reduzierte den Strom von TASK-1 zwar noch signifikant um ca. 20%, was aber ca. um den Faktor 2,6 geringer als beim SCAMP2 Wildtyp ist (Abb. 4.2.1.5). Daher lässt sich vermuten, dass der N-Terminus von SCAMP1 und SCAMP2 eine Rolle bei der Modulation des TASK-1 Stromes spielen.

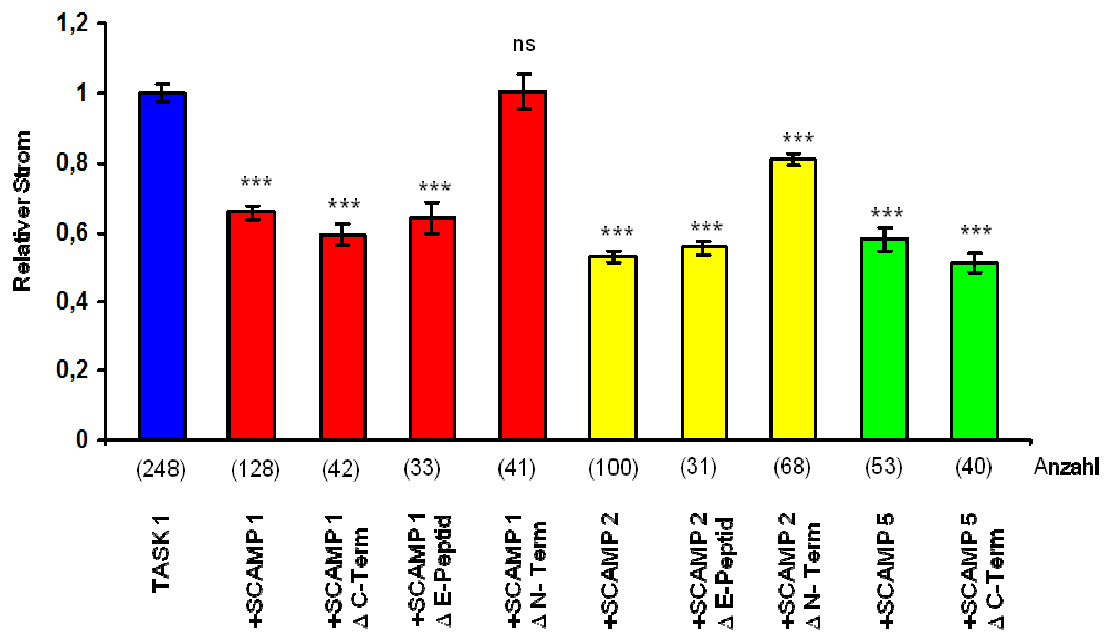


Abbildung 4.2.1.5: Analyse der Wirkung von SCAMP-Mutanten auf den TASK-1-Strom  
 15 ng/μl TASK-1 cRNS wurde mit jeweils 120 ng/μl cRNS von SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 und deren Mutanten in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der TASK-1-Strom bestimmt. Die Δ N-Term Mutanten konnten den Strom von TASK-1 weniger stark verringern als die Wildtyp SCAMPs.

Im Gegensatz zu SCAMP5 befinden sich im langen N-Terminus von SCAMP1 und 2 neben der prolinreichen Sequenz einige NPF-Domänen (Asparagin, Prolin und Phenylalanin). In der Literatur wird dieses Motiv als eine Bindungsstelle für Proteine beschrieben, welche eine **Eps15 homologe Domäne (EHD)** besitzen (Fernández-Chacón *et al.* 2000). EHD-Proteine sind häufig an Endozytoseprozessen beteiligt. Um zu untersuchen, ob die NPFs bei der Verringerung des TASK-1-Stromes eine Rolle spielen, wurden diese deletiert. Beide Deletionsmutanten verringerten den TASK-1-Strom weniger als die jeweiligen Wildtypen (SCAMP1 Δ NPF, 6% Reduktion; SCAMP1 Wt, 40%; SCAMP2 Δ NPF 15% Reduktion; SCAMP2 Wt, 50% beim; Abb. 4.2.1.6).

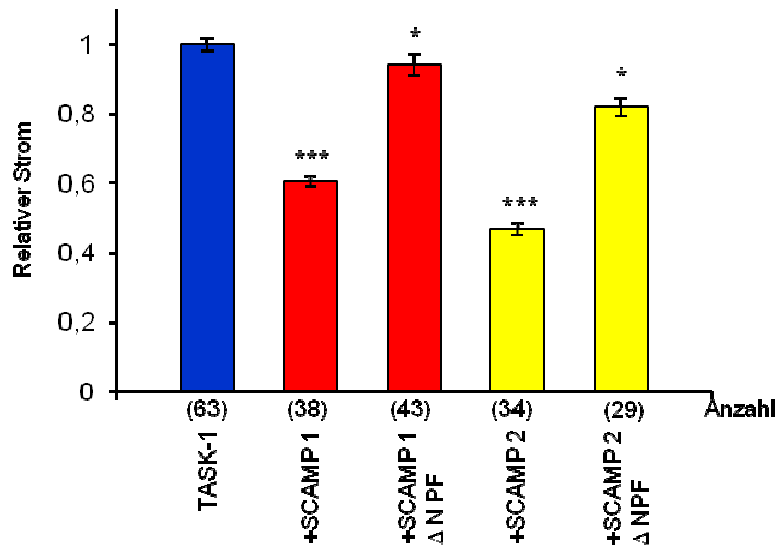


Abbildung 4.2.1.6: Injektion von TASK-1 und SCAMP-Δ NPF

15 ng/μl TASK-1 cRNS wurde mit jeweils 120 ng/μl cRNS von SCAMP1 und SCAMP2 sowie deren Mutanten in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der TASK-1-Strom bestimmt. Die SCAMP-Konstrukte ohne NPFs reduzierten den TASK-1-Strom weniger im Vergleich zu den Wildtypen.

Es wurde ein Oberflächenassay durchgeführt, um nachzuweisen, dass sich der verringerte Effekt der SCAMP-Mutationen auf TASK-1 auch in einer veränderten Oberflächenexpression des Kanals bemerkbar macht. Der Oberflächenassay bestätigte, dass die Δ N-Terminus- sowie die Δ NPF-SCAMP-Mutanten im Vergleich zum den Wildtypen die Oberflächenexpression von TASK-1 weniger stark verringern (Abb. 4.2.1.7).

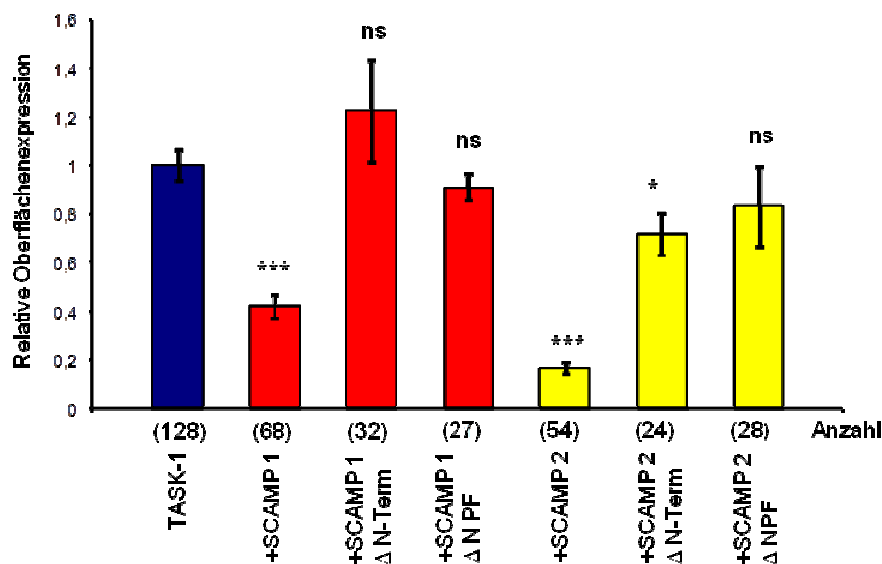


Abbildung 4.2.1.7: Einfluss von SCAMP-Δ NPF auf die Oberflächenexpression von TASK-1

Es wurde TASK-1 zusammen mit verschiedenen SCAMP-Konstrukte in Oozyten injiziert und anschließend die Oberflächenexpression von TASK-1 bestimmt. Eine deutliche Reduzierung von TASK-1 Kanälen an der Zelloberfläche trat bei nur bei Koinjektion mit den SCAMP Wildtypen auf. Bei den Mutanten ohne N-Terminus oder NPFs war nur eine geringe bis keine Reduktion erkennbar (ns: nicht signifikant).

### Analyse der Ursachen für die Reduktion von TASK-1 an der Oberfläche

Wie die funktionellen Analysen der Wirkung der SCAMP-Mutanten auf TASK-1 zeigten, spielen die NPF-Domänen in SCAMP1 und 2 eine wichtige Rolle bei der Verringerung der Stromstärke und bei der Reduzierung der Oberflächenexpression (Abb. 4.2.1.8). Zur Klärung der Frage, ob der Kanal verstärkt von der Zelloberfläche entfernt wird (Endozytose) oder der Vorwärtstransport an die Membran verringert ist, wurden Inhibitoren der Endozytose eingesetzt. Als erster Inhibitor wurde Nystatin eingesetzt, welcher vorwiegend die caveolaevermittelte Endozytose blockiert. Hierzu wurden 24 h nach der Injektion der cRNS die Oozyten für weitere 24 h mit 10 µg/µl Nystatin inkubiert und anschließend der TASK-1-Strom gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass Nystatin keinen signifikanten Einfluss auf die Reduktion des TASK-1 Stromes durch SCAMPs in Oozyten hat (Abb. 4.2.1.8). Das lässt vermuten, dass der Strom reduzierende Effekt der SCAMPs nicht auf einer Erhöhung der caveolaevermittelten Endozytose beruht.

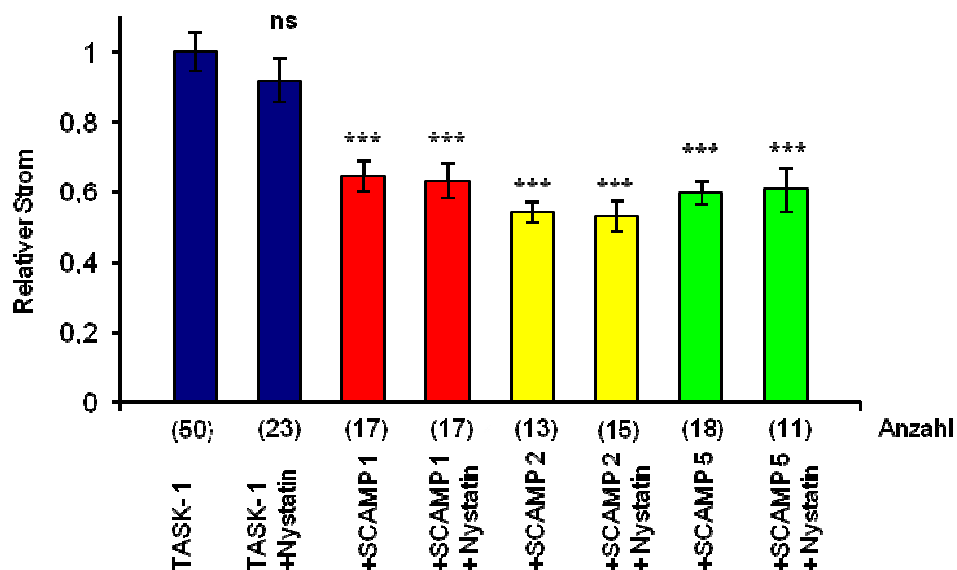


Abbildung 4.2.1.8: Effekt von Nystatin auf den TASK-1-induzierten Strom

Es wurde TASK-1 zusammen mit verschiedenen SCAMPs in Oozyten injiziert und anschließend der Strom von TASK-1 nach Inkubation mit Nystatin gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass Nystatin keine Wirkung auf den Effekt der SCAMPs hat (ns: nicht signifikant).

Als Inhibitor der clathrinvermittelten Endozytose wurde Dynasore eingesetzt. Dynasore blockiert die Endozytose, indem es die GTPasen Dynamin 1 und 2 inhibiert. Bei diesem Ansatz wurden die Oozyten für 24 h vor der Messung mit 1 µM Dynasore inkubiert. Aus der Abbildung 4.2.1.9 geht hervor, dass bei einer Inkubation mit Dynasore der Effekt der SCAMPs auf den TASK-1 induzierten

Strom eliminiert bzw. signifikant verringert ist. Diese Befund legt nahe, dass TASK-1 unter dem Einfluss der SCAMP Proteine verstärkt Clathrin vermittelt endozytiert wird.

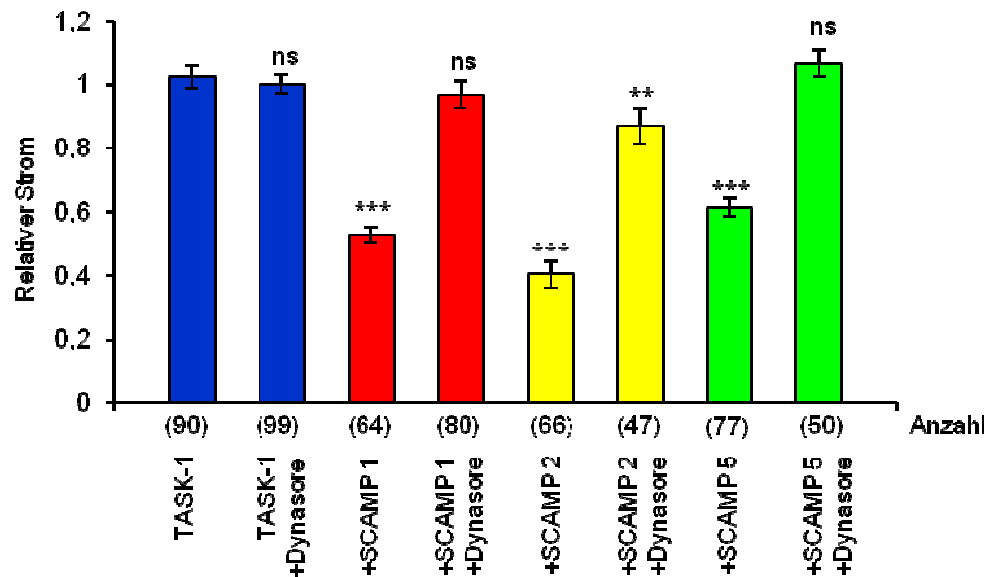


Abbildung 4.2.1.9: Relativer TASK-1 Strom in Abhängigkeit von Dynasore  
15 ng/ $\mu$ l TASK-1 cRNS wurde mit jeweils 120 ng/ $\mu$ l cRNS von SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP +/- 1 $\mu$ M Dynasore in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der TASK-1-Strom bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Dynasore die Wirkung der SCAMPs auf TASK-1 aufhebt (ns: nicht signifikant).

Anschließend wurde eine dominant negative Mutante des Adapterproteins AP180 (AP180C) verwendet, um zu testen, ob es sich um clathrinabhängige Endozytose handelt. Diese Mutante besteht nur noch aus dem C-Terminus von AP180 und hemmt kompetitiv die clathrinabhängige Endozytose. Nach Koexpression von AP180C mit TASK-1 und einem der SCAMPs war der strom-reduzierende Effekt der SCAMPs weniger ausgeprägt (Abb. 4.2.1.10).

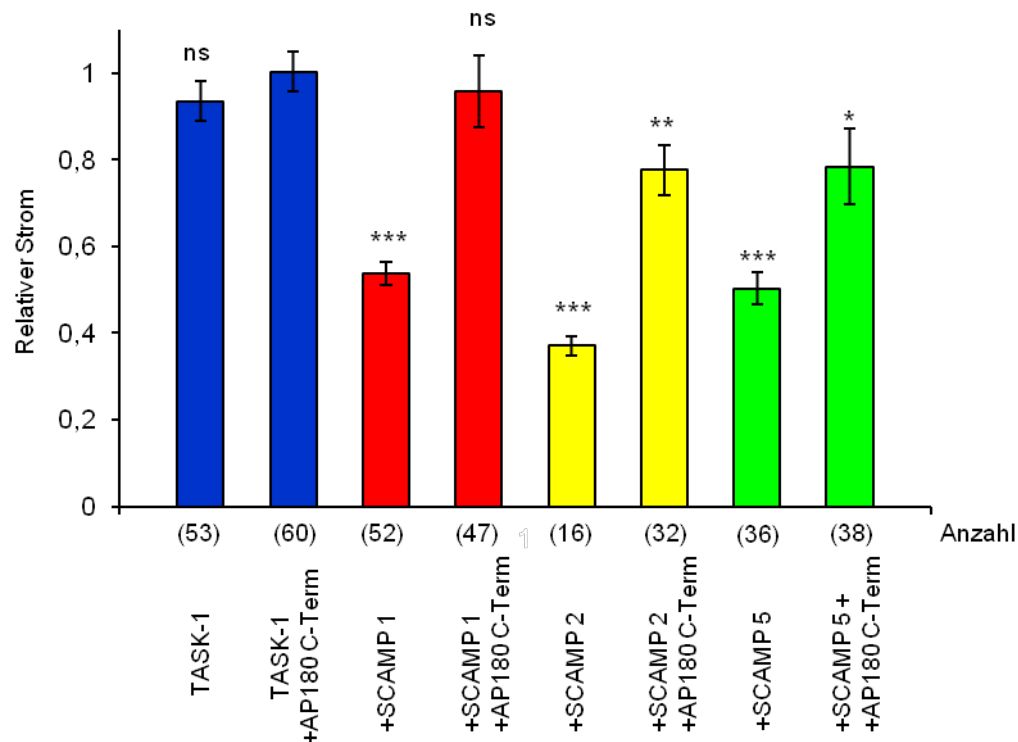


Abbildung 4.2.1.10: Einfluss von AP180 C auf den TASK-1 Strom.

15 ng/μl TASK-1 cRNS wurde mit jeweils 120 ng/μl cRNS von SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 +/- 120 ng/μl cRNS AP180-C-EGFP in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der TASK-1-Strom bestimmt. Die Reduktion des Stromes von TASK-1 durch die SCAMPs wird bei einer Trippelinjektion von TASK-1 mit SCAMP und GFP-AP180 verringert (ns: nicht signifikant).

## Sandwich-Hypothese

Im Hefe-Zwei-Hybrid-Assay konnte keine direkte Interaktion zwischen SCAMP1 bzw. SCAMP2 und TASK-1 nachgewiesen werden. Jedoch hatten alle SCAMPs einen Effekt auf die Stromamplitude von TASK-1. Mittels einer RT-PCR wurde nachgewiesen, dass in Oozyten alle drei SCAMPs exprimiert werden. Bezug nehmend auf das Ergebnis der RT-PCR lässt sich postulieren, dass SCAMP5 als Adapterprotein zwischen SCAMP1 bzw. SCAMP2 und TASK-1 fungieren könnte (Abb. 4.2.1.11)

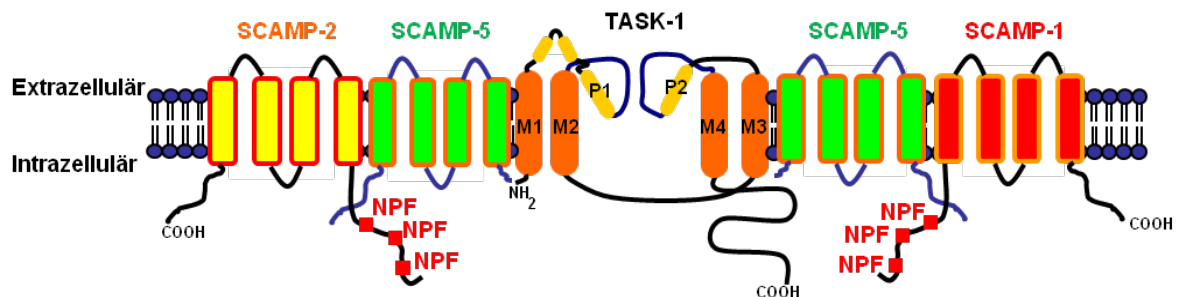


Abbildung 4.2.1.11 Schematische Darstellung der Sandwich-Hypothese von TASK-1 und den SCAMPs

Zur Überprüfung dieser Hypothese, wurden Triple- und Quadroinjektionen durchgeführt. Bei Tripleinjektion von TASK-1, SCAMP5 und SCAMP1 oder SCAMP2 war die Reduktion des Stroms vergleichbar (SCAMP1) oder leicht stärker (SCAMP2) als bei Koexpression von TASK-1 und SCAMP5 alleine. Die Koinjektion der  $\Delta$ NPF - Mutanten hatten eine leicht verringerte Stromreduzierung im Vergleich zu den Wildtypen zur Folge. Nach Quadroinjektion von TASK-1 mit SCAMP5, SCAMP1 $\Delta$  NPF und SCAMP2 $\Delta$  NPF betrug die Verringerung des TASK-1-Stroms nur noch ca. 16% (Abb. 4.2.1.12). Diese Verringerung des Effekts von SCAMP1 und SCAMP2 auf den Strom lässt sich am ehesten mit der Hypothese erklären, dass die  $\Delta$ NPF - Mutanten mit den endogenen Wildtypen um die Bindung an SCAMP5 konkurrieren und so die Endozytose des Kanals verringern.

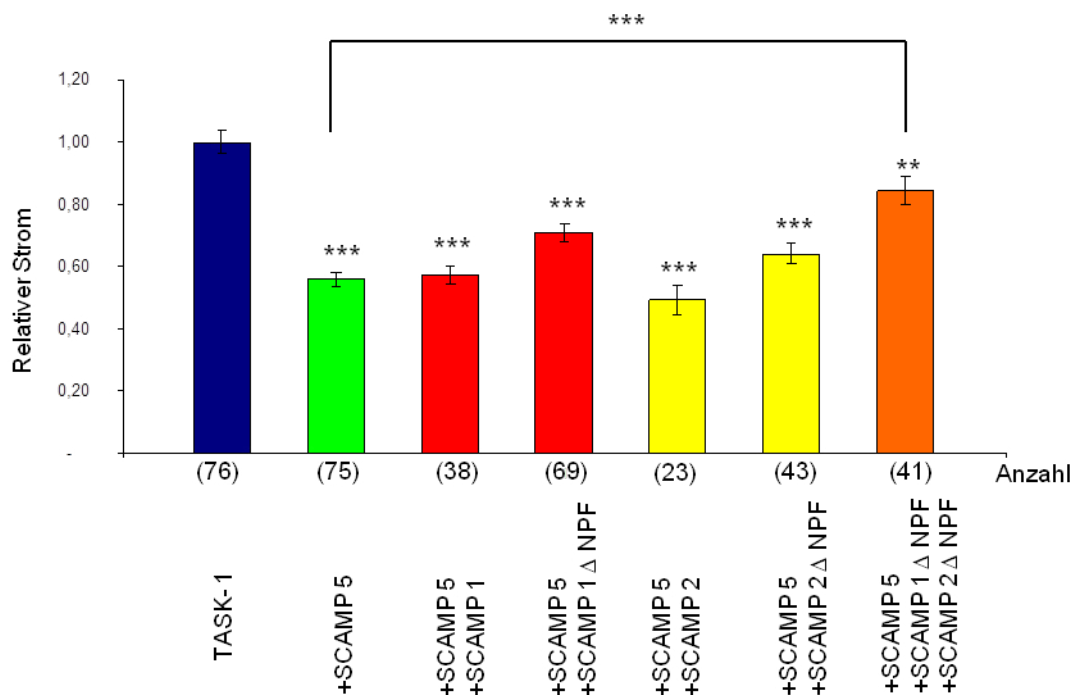


Abbildung 4.2.1.12: Relativer TASK-1 Strom unter dem Einfluss der SCAMP $\Delta$ NPF -Mutanten  
15 ng/ $\mu$ l TASK-1 cRNS wurde mit jeweils 120 ng/ $\mu$ l cRNS der verschiedenen SCAMPs in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der TASK-1-Strom bestimmt.

Da die SCAMPs Homo- und Heterodimere bilden können, wurde versucht Proteinbereiche einzugrenzen, welche an der Dimerisierung beteiligt sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion des C-Terminus und des E-Peptids von SCAMP1 und 2 keinen Einfluss auf den Strom von TASK-1 haben (Abb. 4.2.5), so dass entsprechende Bereiche eher nicht in Frage kommen.



Daher wurden verschiedene Deletionen in SCAMP5 (Abb. 4.2.1.13) eingebracht und deren Einfluss auf den TASK-1-Strom untersucht. Würde durch die eingefügten Veränderungen die Homo- bzw. Heterodimerbildung unterbunden werden, so sollte, gemäß der Sandwich-Hypothese, der TASK-1-Strom weniger stark reduziert werden.

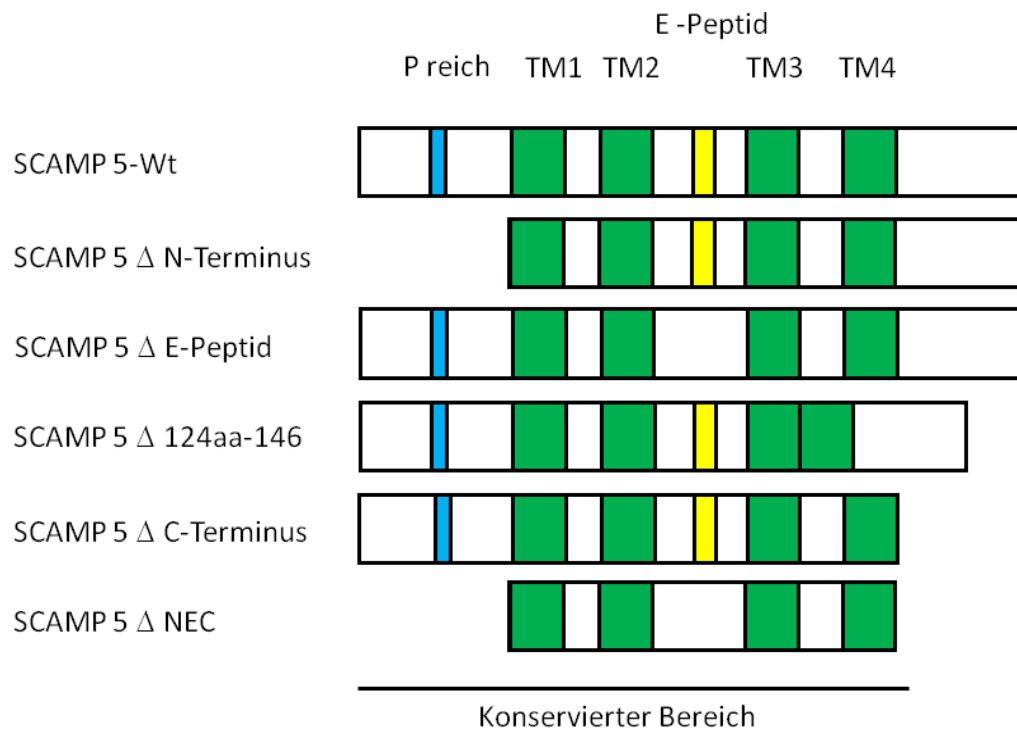


Abbildung 4.2.1.13: Schematische Darstellung von SCAMP5 mit den jeweils eingefügten Mutationen

In den SCAMPs wurden daher verschiedene zytosolische Proteinbereiche deletiert. Den Mutationen fehlt der N- und/oder der C-Terminus, das E-Peptid oder der Bereich zwischen den Transmembrandomänen (TM) 3 und 4. Der Bereich zwischen TM1 und 2 besteht nur aus vier bis fünf Aminosäuren und wurde nicht als Interaktionsdomäne in Betracht gezogen (Abb. 4.2.1.14).

Interessanterweise hat keine der hier getesteten Mutationen einen Einfluss auf den stromreduzierenden Effekt von SCAMP5. Dies legt den Verdacht nahe, dass an der Homo- und Heterodimerbildung die Transmembrandomänen beteiligt sind. Auch zeigte sich, dass der zytoplasmatische Teil von SCAMP5 nicht direkt für die Bindung an TASK-1 notwendig ist.

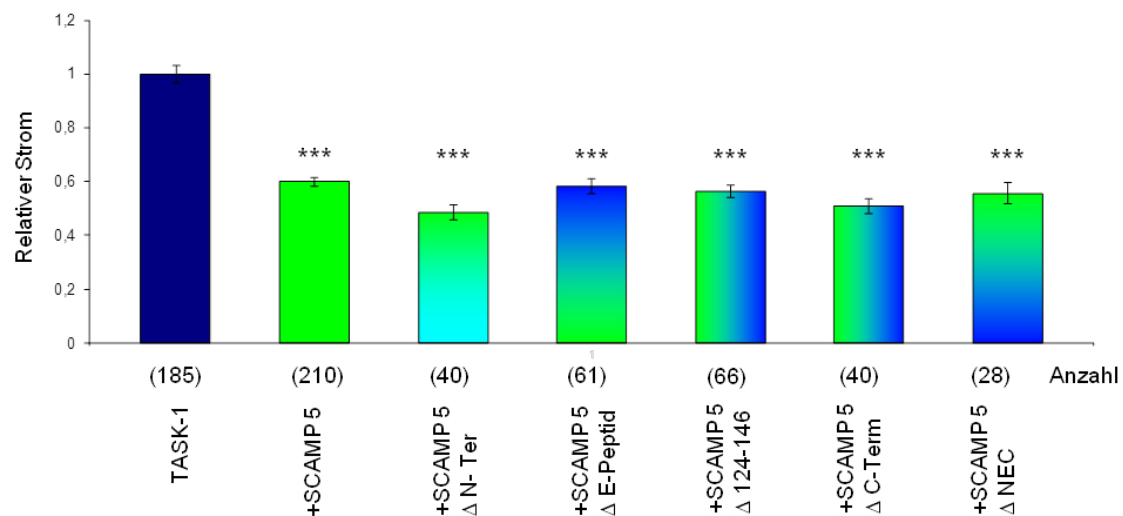


Abbildung 4.2.1.14: Relativer TASK-1 Strom in Abhängigkeit von SCAMP5-Mutanten  
 15 ng/ $\mu$ l TASK-1 cRNS wurde mit jeweils 120 ng/ $\mu$ l cRNS von SCAMP5 in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der TASK-1-Strom bestimmt.

#### 4.2.2. Untersuchung der Spezifität der SCAMP - Interaktion mit TASK-1

Es wurde der Einfluss der SCAMPs auf andere  $K_{2P}$ -Kanäle untersucht, um zu ermitteln, wie spezifisch die Interaktion von SCAMPs mit dem  $K_{2P}$ -Kanal TASK-1 ist. Es konnte bereits im Hefe-2-Hybrid-Assay gezeigt werden, dass keine direkte Interaktion von TASK-3 oder TASK-5 mit den SCAMPs stattfindet (Abb. 4.1.1). Für weitere Untersuchungen wurden Strommessungen in Oozyten durchgeführt. TASK-3 ist nach dem phylogenetischen Stammbaum am nächsten mit TASK-1 verwandt. TASK-3 wurde daher analog mit SCAMP1, -2 oder -5 in Oozyten koexprimiert und der Strom mittels TEVC gemessen. Wie man aus der Abbildung 4.2.2.1 erkennen kann, können SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 den Strom von TASK-3 jedoch nicht reduzieren.

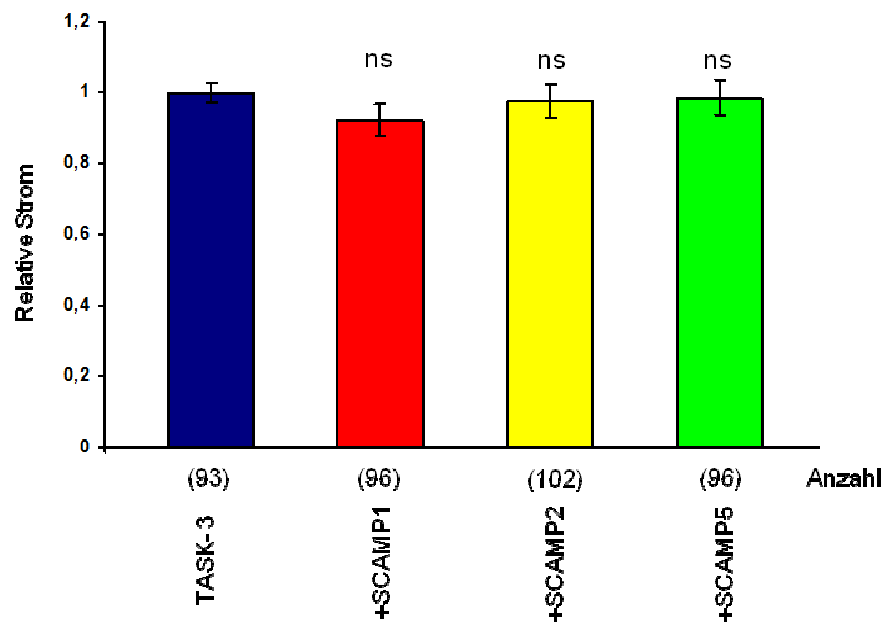


Abbildung 4.2.2.1: Effekt der SCAMPs auf den TASK-3-induzierten Strom  
TASK-3 wurde mit verschiedenen SCAMP-Proteinen in Oozyten koinjiziert und der resultierende Strom bestimmt (ns: nicht signifikant).

Als ein weiterer Vertreter der  $K_{2P}$ - Ionenkanalfamilie wurde TREK-1a verwendet. Das Besondere bei diesem Kanal ist, dass er mehrere Spleißvarianten aufweist. Das bedeutet, dass je nach Spleißvariation ein TREK-1 Kanal mit längeren oder kürzeren N-Terminus hergestellt wird. Der hier verwendete TREK-1a ist die kürzeste Spleißvariante. TREK-1 wurde mit den SCAMPs in Oozyten koinjiziert und der Strom vermessen. Im Gegensatz zu TASK-1, sind SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 nicht in der Lage den TREK-1a-Strom zu reduzieren. Tendenziell ist bei Koexpression der SCAMPs der Strom sogar etwas größer (Abb. 4.2.2.2).

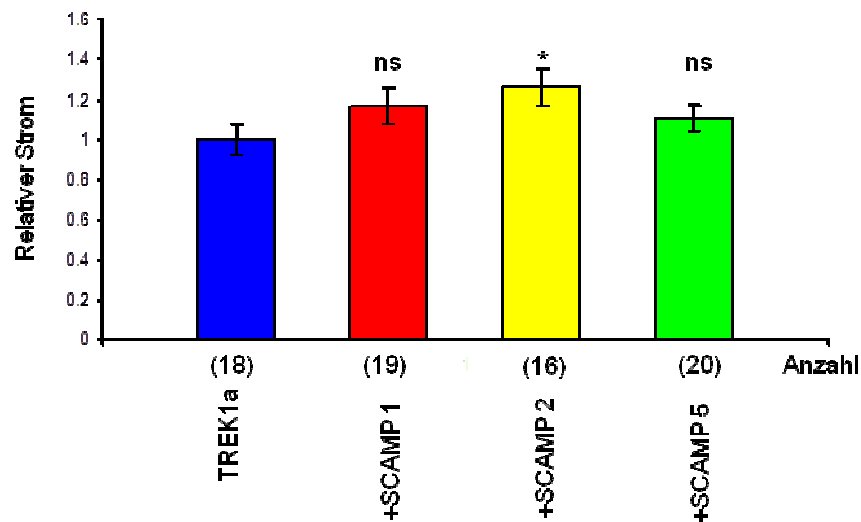


Abbildung 4.2.2.2: Effekt der SCAMPs auf den TREK1a-induzierten Strom  
TREK1a wurde mit verschiedenen SCAMP-Proteinen in Oozyten koinjiziert und der resultierende Strom bestimmt (ns: nicht signifikant).

Mit Kir2.1 wurde ein Kaliumkanal untersucht, welcher nicht zur  $K_{2P}$ -Familie gehört. Dieser Kanal besitzt nur 2 Transmembrandomänen und bildet Tetramere. Analog zu TASK-3 und TREK-1a wurde Kir2.1 zusammen mit den SCAMPs in Oozyten koinjiziert und der Strom bestimmt. Für Kir2.1 gilt jedoch das gleiche wie für TASK-3 und TREK-1a. Die SCAMPs sind nicht in der Lage den Strom von Kir2.1 zu reduzieren (Abb. 4.2.2.3).

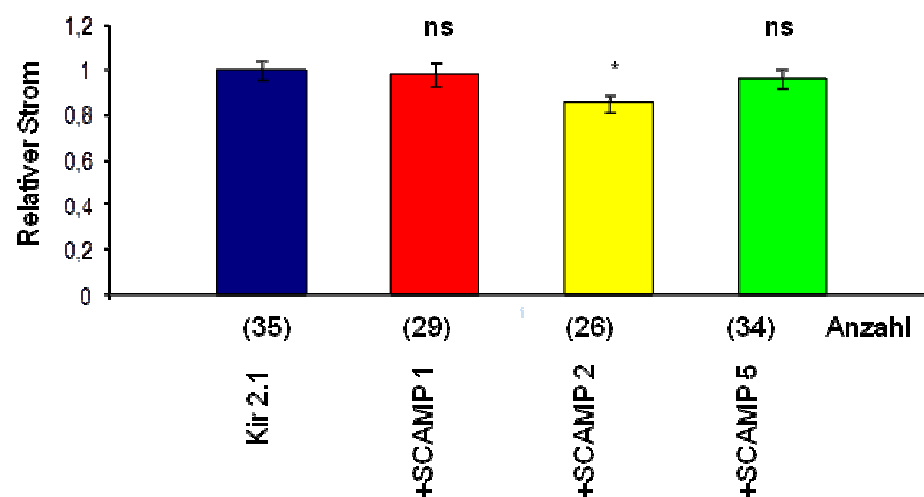


Abbildung 4.2.2.3: Relativer Kir2.1 Strom in Abhängigkeit von SCAMPs  
15 ng/μl Kir2.1 cRNS wurde mit jeweils 120 ng/μl cRNS der verschiedenen SCAMPs in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der Kir2.1-Strom bestimmt. (ns: nicht signifikant)

Da die SCAMP - Proteine weder mit TASK-3 und TASK-5 interagieren noch den Strom von TASK-3, TREK-1a und Kir2.1 reduzieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hier um einen TASK-1 spezifischen Effekt handelt.

#### 4.2.3. Charakterisierung der Interaktion der TASK-1 Bindungsstelle

Es wurden verschiedene TASK-1-Konstrukte getestet, um zu ermitteln, welche Region von TASK-1 für die Interaktion mit SCAMP5 notwendig ist. Als erstes wurden zwei Chimären untersucht, bei denen der C-Terminus vertauscht wurde. Wie in Abbildung 4.2.3.1 zu erkennen ist, wurde Strom der TASK-3/1 Chimären (TASK-3 mit dem C-Terminus von TASK-1) wird durch SCAMP1, SCAMP 2 und SCAMP5 deutlich reduziert. Die Stromreduktion fiel jedoch etwas geringer aus als bei den Experimenten mit dem TASK-1 Wildtyp (Abb. 4.2.1.3). Bei den TASK-1/3 Chimären (TASK-1 mit dem C-Terminus von TASK-3) hatten SCAMP1 und SCAMP5 keinen Effekt, während SCAMP2 eine geringfügige Reduktion bewirkte (um ca. 20 %).

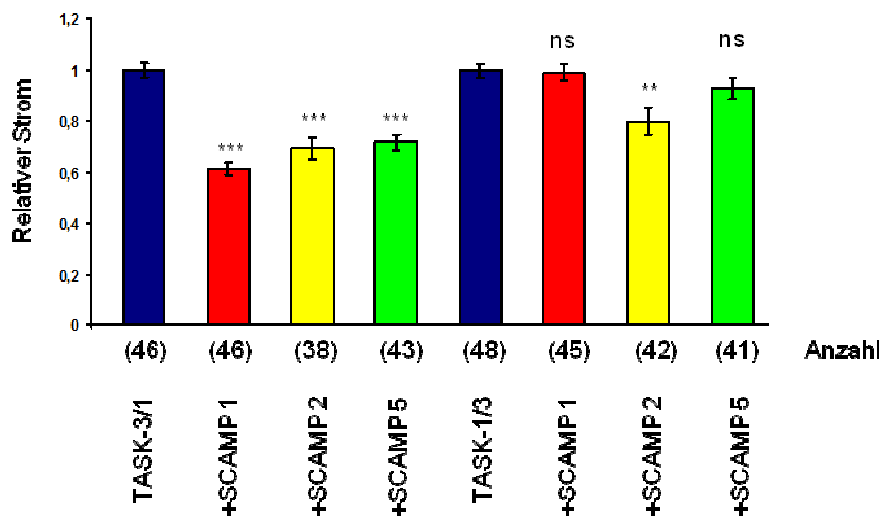


Abbildung 4.2.3.1: Einfluss der SCAMPs auf den Strom von TASK-1/TASK-3-Chimären  
15 ng/μl TASK-1/3 Chimären cRNS wurde mit jeweils 120 ng/μl cRNS der verschiedenen SCAMPs in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der Strom bestimmt. (ns: nicht signifikant)

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der C-Terminus von TASK-1 von entscheidender Bedeutung für die Interaktion mit den SCAMPs ist. Zur weiteren Eingrenzung des Bereichs wurde als nächstes die Mutante TASK-1  $\Delta$  20 verwendet. Bei dieser Mutante wurden 20 Aminosäuren des C-Terminus entfernt, welche wichtig für die Interaktion mit dem Protein p11 sind (Renigunta *et al.* 2006, Rajan *et al.*, 2002). Die Entfernung dieser Aminosäuren hatte

jedoch keine Auswirkung auf den stromreduzierenden Effekt der SCAMPs (Abb. 4.2.3.2).

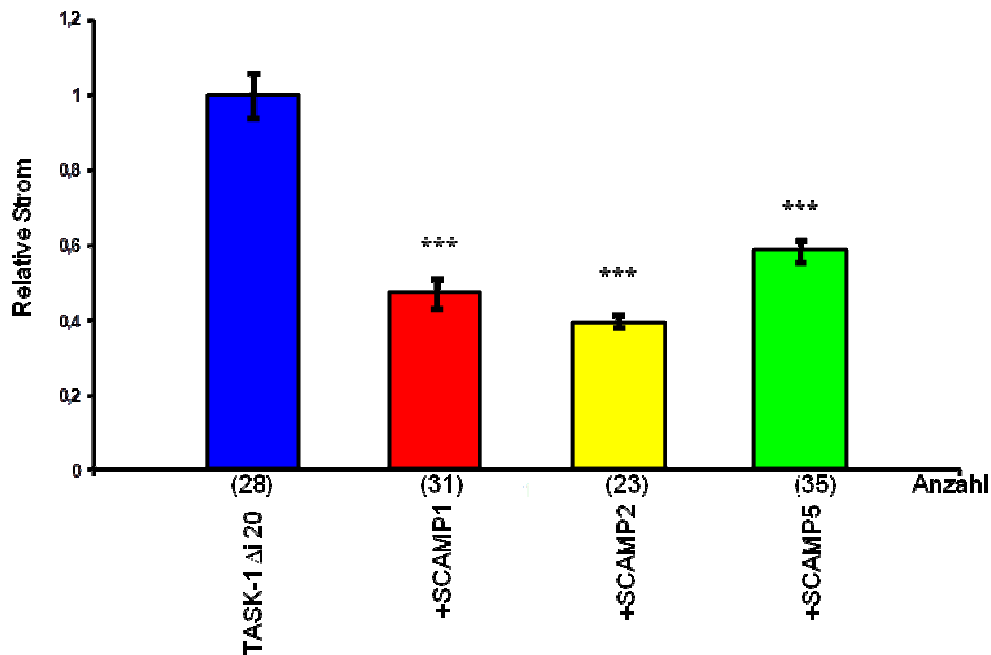


Abbildung 4.2.3.2: Einfluss der SCAMPs auf den Strom von TASK-1 $\Delta$ i20

Es wurde von TASK-1 $\Delta$ i20 bei jeder Injektion eine Konzentration von 15 ng/ $\mu$ l und für die SCAMPs von 120 ng/ $\mu$ l verwendet.

Gleichermaßen zeigte die Mutante von TASK-1 $\Delta$ 247-354, bei der ein großer Bereich des C-Terminus von TASK-1 deletiert wurde, nur eine kleine Veränderung des stromreduzierenden Effektes der SCAMPs (Abb. 4.2.3.3).

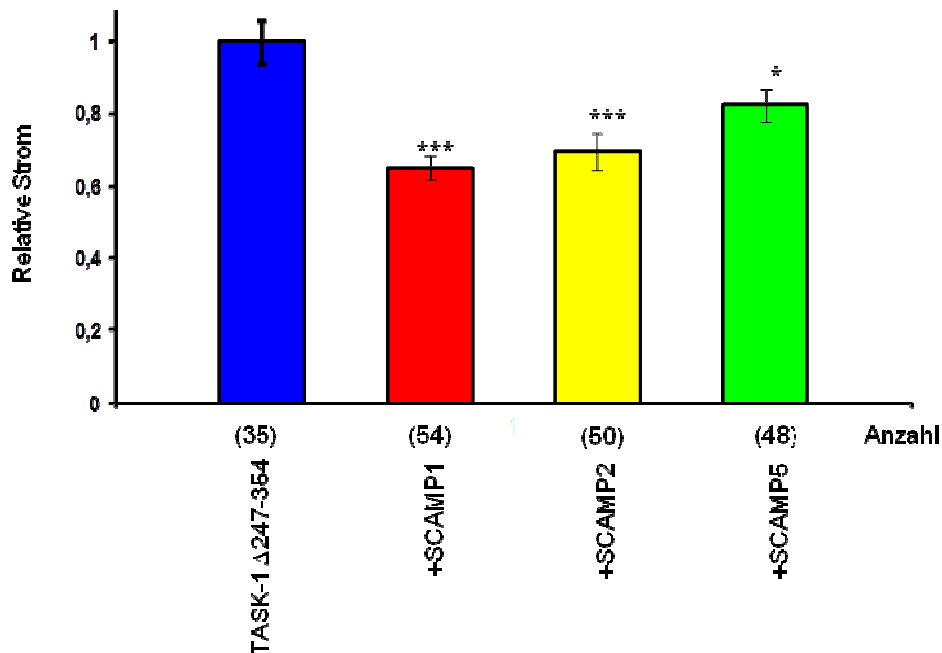


Abbildung 4.2.3.3: Relativer TASK-1 $\Delta$ 247-354Strom in Abhängigkeit von SCAMPs

Es wurde von TASK-1 $\Delta$ 247-354 bei jeder Injektion eine Konzentration von 15 ng/ $\mu$ l und für die SCAMPs von 120 ng/ $\mu$ l verwendet.

Infolge dieser Experimente konnte die Domänen von TASK-1, die bei der Interaktion mit den SCAMPs eine Rolle spielen, auf den C-Terminus eingengt werden. Die i20 Domäne im C-Terminus von TASK-1 (die Bindungsstelle für p11, siehe Renigunta *et al.* 2006) spielt wohl bei der Interaktion mit den SCAMPs keine Rolle. Für den schwachen Effekt von SCAMP2 auf die TASK-3/-1 Chimäre haben wir noch keine Erklärung. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme des TASK-1 Stromes nach Koinjektion mit den SCAMPs ist, dass die SCAMPs die Endozytose des Kanals stimulieren (vergl. Abb. 4.2.9). Um diese Frage zu klären, wurde die Mutante TASK-1 Y300A untersucht. An Position 300-303 befindet sich ein Endozytose Motiv (YAEV), welches durch den Austausch von Tyrosin (Y) zu Alanin (A) inaktiviert wird. Für den Interaktionspartner Syntaxin-8 wurde gezeigt, dass die Mutation dieses Motivs zu einer verringerten Endozytoserate führt (Renigunta *et al.* 2014). Im Gegensatz dazu hatte diese Mutation jedoch keinen messbaren Einfluss auf den Effekt der SCAMPs (Abb. 4.2.3.4). Vermutlich spielt daher das Endozytosemotiv YAEV300-303 bei der Wirkung der SCAMPs auf die TASK-1 Kanäle keine Rolle.

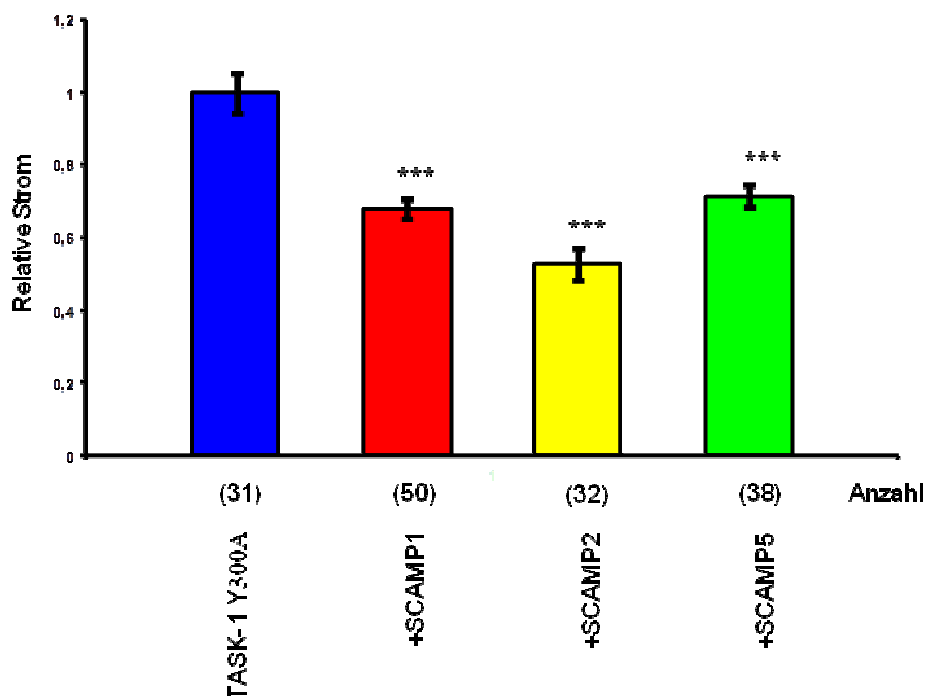


Abbildung 4.2.3.4: Relativer TASK-1 Y300A Strom in Abhängigkeit von SCAMPs  
15 ng/μl TASK-1 Y300A cRNS wurde mit jeweils 120 ng/μl cRNS der verschiedenen SCAMPs in Oozyten koinjiziert. Anschließend wurde der TASK-1-Strom bestimmt.

### **4.3. Biochemische Untersuchung der Proteininteraktionen**

Es wurde die Methode des GST- bzw. His Pull Downs verwendet, um eine direkte biochemische Interaktion von Proteinen nachzuweisen.

Dabei wird ein Teil des zu untersuchenden Proteins (Köder) mit der Glutathion-S-Transferase (GST) oder das gesamte Protein mit einer 6x-Histidin-Sequenz (His) fusioniert. Mit Hilfe dieser Tags können nun alle Bindungspartner (Beute), welche stark genug an die fusionierte Proteindomäne binden, präzipitiert werden.

#### **4.3.1. GST- Pull Down Assay**

In den Strommessungen in Oozyten wurde gezeigt, dass der N-Terminus von SCAMP1 und SCAMP2 Einfluss auf die Reduktion des Stromes von TASK-1 nehmen. Zur weiterführenden Untersuchung dieses Ergebnisses wurde die biochemische Methode des GST-Pull Downs verwendet. Bei dieser Methode wurde der N-Terminus von SCAMP1 oder 2 mit GST fusioniert. In der folgenden Abbildung A wurde in der ersten Spur für GST-SCAMP1 der Überstand aufgetragen und in der zweiten Spur die Präzipitation. Das gleiche gilt auch für GST-SCAMP2 (siehe Abb. 4.3.1.1 A Spur 3 und 4). Wie aus der Abbildung hervor geht, konnte mit Hilfe der GST- bindenden Beads, der N-Terminus von SCAMP1 oder 2 erfolgreich präzipitiert werden (Bande bei 40 kDa). In Abbildung 4.3.1.1 B wurden dieselben Proben wie in A pipettiert. In der ersten und dritten Spur wurde jeweils der Überstand aufgetragen und in der zweiten und vierten Spur die Präzipitation. Das Ergebnis dieses Pull Downs zeigte, das TASK-1-EGFP nur im Überstand eine Bande von ca. 70 kDa aufwies. Daher konnte der Kanal nicht präzipitiert werden.

Wenn der C-Terminus von TASK-1 an GST fusioniert wurde und ein GST-Pull Down durchgeführt wurde, wurde das gleiche Auftragungschema verwendet. In Abbildung 4.3.1.1 C ist die Präzipitation des TASK-1-GST-Konstruktes und dessen erfolgreiche Präzipitation dargestellt (Bande bei 45 kDa). In der Abbildung 4.3.1.1 D ist der ersten, dritten und fünften Spur ist jeweils der Überstand und in der zweiten, vierten und sechsten Spur jeweils die Präzipitation von SCAMP1, 2 und 5-Myc aufgetragen. Wie sich gezeigt hat,



könnten nur Banden im Überstand (Bande jeweils bei ca. ca. 38 kDa (SCAMP1), ca.40 kDa (SCAMP2) und ca. 28 kDa (SCAMP5) detektiert werden. Das zeigt, dass der C-Terminus von TASK-1 SCAMP1, 2 und 5-Myc nicht präzipitieren konnte.

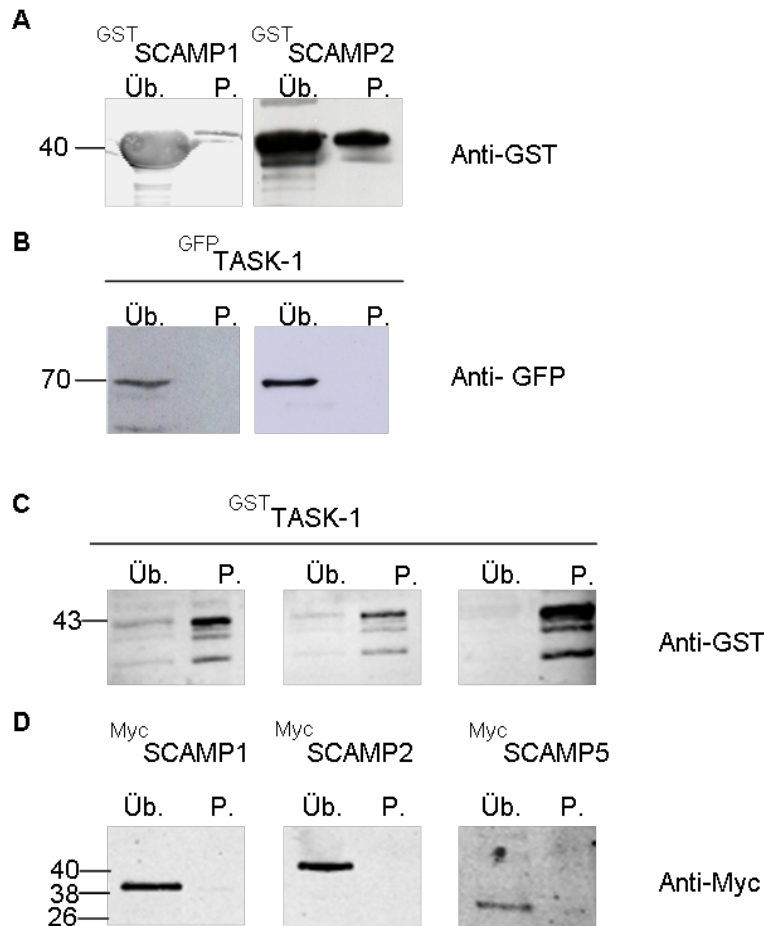


Abbildung 4.3.1.1: GST-Pull Down

Verschiedene GST-Konstrukte wurden in E.coli BL21 und GFP- sowie Myc-Konstrukte wurden in HeLa Zellen überexprimiert und GST-Pull Downs durchgeführt. A, und C zeigt den Nachweis des „Köder“-Proteins. B und D zeigen den Nachweis des „Beute“. TASK-1-EGFP (70,24 kDa) lässt sich nicht mit SCAMP1-GST (A, B) oder SCAMP2-GST (A, B) präzipitieren. GST-TASK-1 kann weder SCAMP5-Myc (C, D), noch SCAMP1-Myc oder SCAMP2-Myc (C, D) präzipitieren. P: Präzipitation, Üb.: Überstand TASK-1-EGFP: 70,24 kDa, GST-TASK-1: ca. 43 kDa SCAMP5-Myc: ca. 26 kDa, SCAMP1 ca.38 kDa und 2-Myc: ca.40kDa

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen aus dem Hefe-2-Hybrid-System. In diesem Assay konnte eine direkte Interaktion von TASK-1 mit SCAMP5 nachgewiesen werden (Abb. 4.1.1).

Aus der Strommessung in Oozyten geht hervor, dass der C-Terminus von TASK-1 bei der Interaktion mit den SCAMPs von Bedeutung ist (Abb. 4.2.3.1). In dem GST-Pull Down Assay konnte keine Interaktion des C-Terminus von TASK-1 mit den SCAMPs nachgewiesen werden. Entweder ist der C-Terminus

von TASK-1 für die Interaktion mit den SCAMPs notwendig, jedoch scheint er noch lange nicht hinreichend zu sein. Oder möglicherweise zeigt der GST-Pull Down Assay hier seine Limitation, da nur ein Teil des zu untersuchenden Proteins fusioniert ist.

#### **4.3.2. His- Pull Down Assay**

Es wurden erweiterte Untersuchungen mittels des His- Pull Down (PD) durchgeführt. Im His-Pull Down wurde ein poly-Histidin-Tag an den C-Terminus einer vollständigen Aminosäuresequenz gehängt. Mit Hilfe von His-bindenden Beads wird das Fusionsprotein präzipitiert. Sollte das Protein an dem ein poly-Histidin-Tag (6 Histidine) angefügt wurde mit einem weiteren Protein interagieren, so wird auch dieses Protein präzipitiert.

In Abbildung 4.3.2.1 A ist der Überstand und die Präzipitation von SCAMP1, 2 und 5-His dargestellt. Wie aus der Abbildung 4.3.2.1 A entnommen werden kann, erkennt man jeweils eine Bande (bei ca. 38 kDa für SCAMP1 und 2 sowie ca. 28 kDa SCAMP5) in der zweiten Spur wo die Präzipitation (P.) wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass alle SCAMP-His Proteine durch die His-bindenden Beads präzipitiert wurden.

In der folgenden Abbildung 4.3.2.1 B, wurden dieselben Proben wie in A aufgetragen. Wie man erkennt, erscheint jeweils eine Bande bei ca. 25 kDa im Überstand (Üb.) und in der Präzipitation (P.) in Spur 1-4. Was aus diesem Resultat hervor geht, ist das SCAMP1-His und SCAMP2-His in der Lage sind einen Teil des eingesetzten Proteins SCAMP5-Myc zu präzipitieren. Das gleiche gilt für SCAMP5 Abbildung 4.3.2.1 B Spur 5 und 6. In Spur 5 (Üb.) und in der Präzipitation (P.) Spur 6 erkennt man jeweils eine Bande bei ca. 27 kDa. Das zeigt, zum einen das die Präzipitation nicht vollständig erfolgte und zum anderen dass auch SCAMP5-His in der Lage ist SCAMP5-Myc zu präzipitieren. Um auszuschließen, dass der Myc-Tag die Interaktion der Proteine nachhaltig beeinflusst, wurde in weiterführenden Experimenten SCAMP5-His als „Köder-Protein“ im His-Pull Down eingesetzt. Das Ergebnis dieses Pull Down ist in der nachfolgenden Abbildung C und D dargestellt. In D ist jeweils erst der Überstand (Üb.) von den His-bindende Bead-Proteinkompelx aufgetragen und in der Spalte die mit P. markiert ist, die Präzipitation (His-bindende Bead-

Proteinkomplex) aufgetragen. Wie aus der Abbildung 4.3.2.1 D hervor geht, erkennt man eine Bande bei ca. 28 kDa in allen Spalten die mit P. beschriftet sind. Dies zeigt, dass SCAMP5-His vollständig präzipitiert wurde. In D sind dieselben Proben in der gleichen Reihenfolge aufgetragen worden wie in C. Man erkennt in Überstand und in der Präzipitation von SCAMP1-GFP und SCAMP2-GFP eine Bande bei ca. 64 kDa. Ein ähnliches Resultat erkennt man im Überstand und in der Präzipitation von SCAMP5-GFP, wo eine Bande bei ca. 52 kDa. erscheint. Das zeigt, dass SCAMP5-His einen Teil der Proteine von SCAMP1 und SCAMP2-GFP sowie SCAMP5-GFP präzipitieren konnte und somit das Ergebnis aus derselben Abbildung A-B bestätigt. In einer vorangegangenen Arbeit konnte im Hefe-2-Hybrid-Assay gezeigt werden, dass SCAMP5 mit SCAMP1 und 2 Heterodimere bildet (Gold 2009), was durch den His-Pull Down bestätigt werden konnte.

Damit eine Beeinträchtigung der Interaktion der Proteine durch den GFP-Tag ausgeschlossen werden kann, wurde als Kontrolle ein Pull Down mit GFP durchgeführt (Abbildung 4.3.2.1 E und F) Wie aus F hervor geht erscheint nur eine Bande bei ca. 27 kDa im Überstand (Üb.) Das zeigt, dass SCAMP5-His nicht in der Lage ist mit GFP zu interagieren. Auch eine unspezifische Interaktion zwischen den Beads und GFP kann ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass der GFP-Tag keinen Einfluss auf die Interaktion mit den Proteinen nimmt. Dies verdeutlicht, dass SCAMP5 sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit SCAMP1 und 2 bilden kann. Während die Heterodimerbildung für SCAMP1 und 2 schon beschrieben wurde (Wu *et al.* 1997), so ist die Beobachtung, dass SCAMP5 sowohl SCAMP1 als auch SCAMP2 bindet, neu und unterstützt die Sandwich-Hypothese.

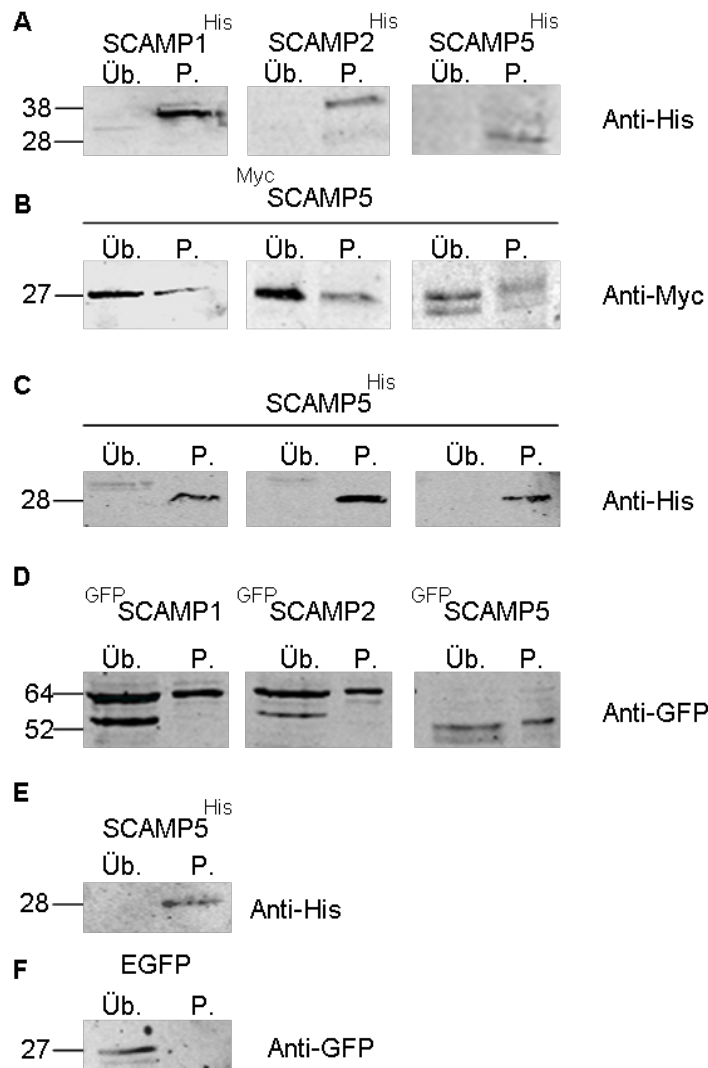


Abbildung 4.3.2.1: HIS-Pull Down

Verschiedene SCAMP-Konstrukte wurden in HeLa Zellen überexprimiert und His-Pull-Downs durchgeführt. A, C und E zeigt den Nachweis des „Köder“-Proteins, und B zeigt den Nachweis des „Beute“-Proteins. SCAMP1-His präzipitiert SCAMP5-Myc (B Spur 2), SCAMP2-His präzipitiert SCAMP5-Myc (B Spur 4) und SCAMP5-His präzipitiert SCAMP5-Myc (B Spur 6). SCAMP5-His präzipitiert SCAMP1-GFP, SCAMP2-GFP und SCAMP5-GFP (D und F) jedoch nicht GFP alleine. P: Präzipitation, Üb.: Überstand SCAMP5-His (ca. 28 kDa), SCAMP1-Myc (38,3 kDa)/ SCAMP1-GFP (64,04 kDa), SCAMP2-Myc (37,4 kDa)/ SCAMP2-GFP (63,09 kDa), SCAMP5-myc (27,05 kDa)/SCAMP5-GFP (52,75 kDa), (26,9 kDa)

Für die Überprüfung ob die Region nach den NPF Domänen bis zur ersten Membrandomäne bei der Interaktion der SCAMP untereinander eine Rolle spielt wurde der N-Terminus von SCAMP5, der keine NPF's besitzt, deletiert (siehe Abbildung 4.2.1.13). Diese Deletionsmutante (SCAMP5  $\Delta$  N-Term) wurde im His-Pull Downs eingesetzt, um festzustellen, ob diese Region (die eine Prolin reiche Sequenzen enthält) für die Homo- und Heterodimerisierung eine Rolle spielt. In der folgenden Abbildung 4.3.2.3 A ist die Präzipitation von SCAMP5-His dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass nur in der

Späte die mit P. markiert ist, erkennt man eine Bande bei ca. 28 kDa. Das lässt auf eine vollständige Präzipitation von SCAMP5-His schließen. In B sind die Präzipitation von SCAMP5-Myc, SCAMP2-Myc und SCAMP1-Myc dargestellt. In der ersten und zweiten Spur erkennt man eine Bande von ca. 27 kDa, was der Größe von SCAMP5-Myc entspricht. In der dritten und vierten Spur erkennt man jeweils eine Bande bei ca. 40 kDa was der Größe von SCAMP2-Myc entspricht und in den letzten zwei Spuren laufen Banden in der Höhe von ca. 38 kDa. Dies entspricht der Größe von SCAMP1-Myc. In allen drei Kombinationen war SCAMP5  $\Delta$  N-Term-His in der Lage die Wildtypformen der SCAMPs zu präzipitieren. Daher scheint der N-Terminus für die Dimerisierung nicht notwendig zu sein (Abb. 4.3.2.3). Diese Befunde stimmen gut mit den Resultaten der Strommessungen in Oozyten überein, in denen gezeigt wurde, dass SCAMP5  $\Delta$  N-Term den TASK-1-Strom ebenso reduzierte wie SCAMP5-Wt (Abb. 4.2.13).

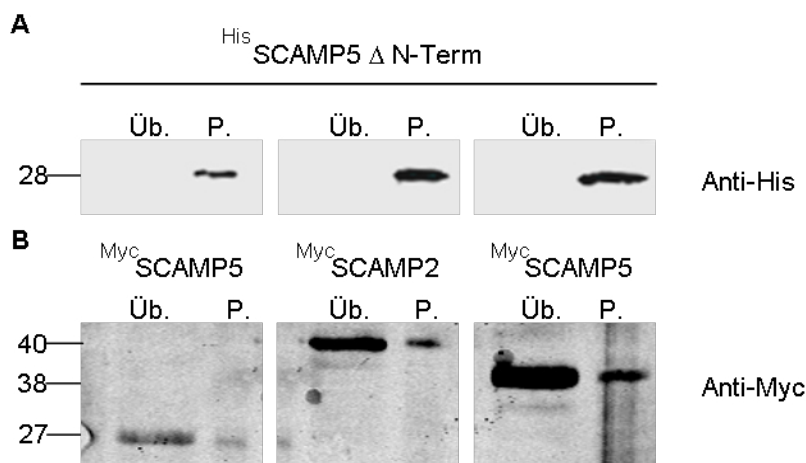


Abbildung 4.3.2.2: SCAMP5  $\Delta$  N-Term HIS-Pull Down mit SCAMP1, SCAMP2, SCAMP5-myc  
 Verschiedene SCAMP-Konstrukte wurden in HeLa-Zellen überexprimiert und His-Pull-Downs durchgeführt. A zeigt den Nachweis des „Köder“-Proteins, B den des „Beute“. SCAMP5 $\Delta$ N-Term präzipitiert SCAMP5, SCAMP1- und SCAMP2-myc P.: Präzipitation, Üb.: Überstand

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SCAMP5 Homo- als auch Heterodimere mit SCAMP1 und SCAMP2 bildet. Ebenso bindet SCAMP5 TASK-1, wodurch die notwendigen Bedingungen für die Sandwich-Hypothese erfüllt sind.

#### **4.4. Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit, die Lokalisation bestimmter Proteine in zellulären Kompartimenten zu untersuchen. Wenn dabei lebende Zellen beobachtet werden, so lassen sich zusätzlich dynamische Prozesse in Videoaufnahmen dokumentieren (live cell imaging). In dieser Arbeit wurden die Proteine dazu entweder mit EGFP, DsRed oder mCherry fusioniert und mittels entsprechender Filtersysteme detektiert.

##### **Lokalisation der SCAMP- Proteine**

Zur Bestimmung der Lokalisation der einzelnen SCAMP-Proteine wurden HeLa Zellen zuerst mit jedem Konstrukt einzeln transfiziert (Abb. 4.4.1). In dieser Zelllinie lässt sich eine Lokalisation in der Membran gut erkennen. Aus diesem Grund wurden HeLa Zellen für die Untersuchung der Lokalisation von den SCAMPs verwendet. In der folgenden Abbildung fällt auf, dass SCAMP1 und SCAMP2 intrazellulär lokalisiert sind. Die weißen Pfeile markieren lineare tubuläre Strukturen die in einigen Zellen aufgedreht sind. SCAMP5 ist ebenfalls eher intrazellulär lokalisiert, wobei es im Vergleich zu SCAMP1 und 2 stärker in der Membran exprimiert wird (Abb. 4.4.1 C). Bei SCAMP5 wurden zusätzlich lineare tubuläre Strukturen innerhalb der Zelle beobachtet (Abb. 4.4.1 C, weiße Pfeile). Beim genaueren Analysieren in Videosequenzen wurde festgestellt, dass die tubulären Strukturen einem kontinuierlichen und schnellen Auf- und Umbau unterworfen sind. Ähnliche Strukturen wurden auch bei einigen SCAMP1 und 2 transfizierten Zellen beobachtet, jedoch weniger häufig als bei SCAMP5.

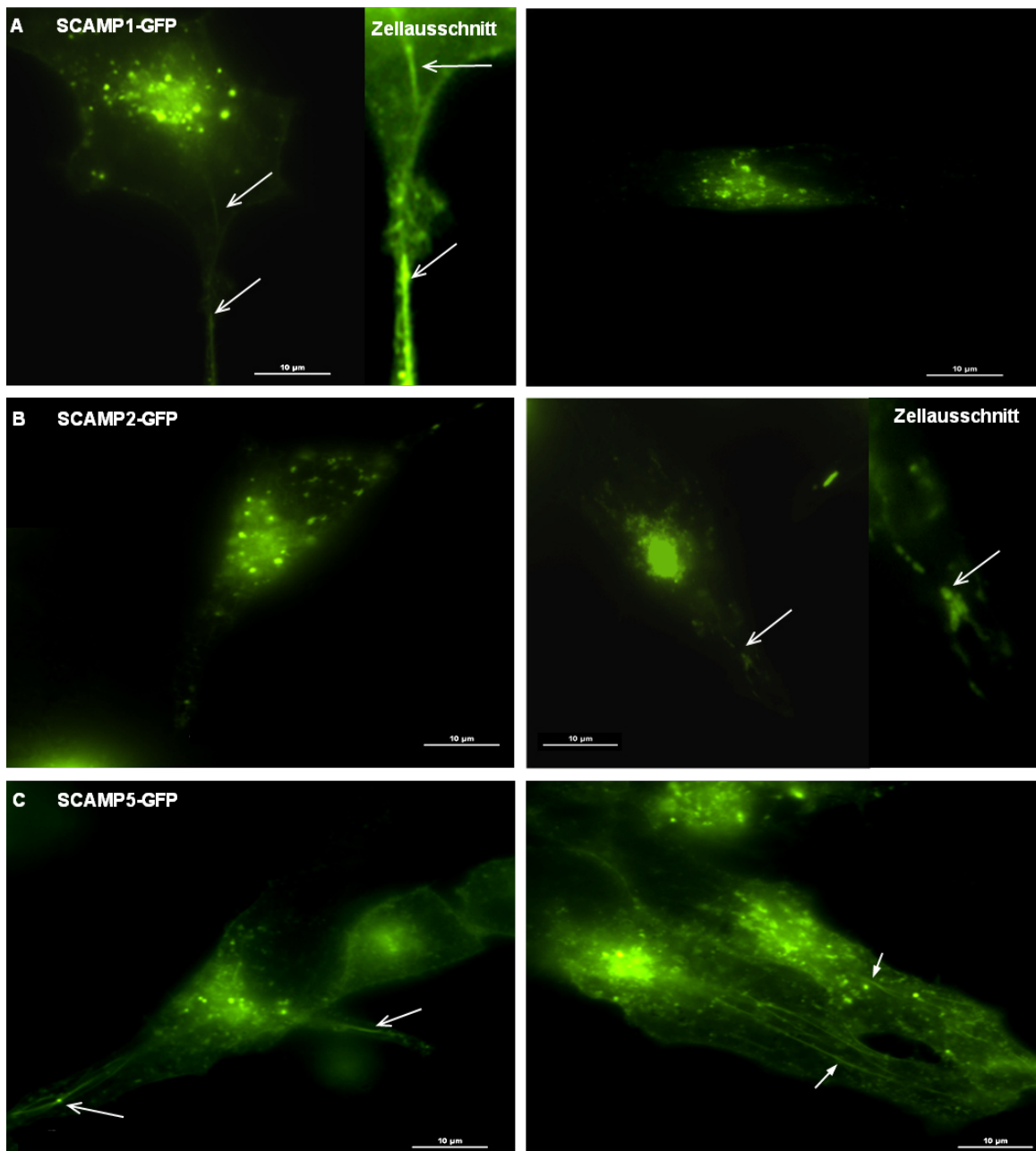


Abbildung 4.4.1: Zelluläre Lokalisation der SCAMP-Proteine  
Einzeltransfektion von SCAMP1-GFP (A), SCAMP2-GFP (B) und SCAMP5-GFP (C) in HeLa Zellen. Die Analyse erfolgte jeweils 24h nach der Transfektion. Pfeile markieren lineare Strukturen.

Grundsätzlich scheinen SCAMP1 und SCAMP2 vorwiegend intrazellulär lokalisiert zu sein, bei einigen Zellen sind die Proteine auch in der Zellmembran detektierbar. Möglicherweise kommen diese zwei Proteine nur transient in der Membran vor, was ein Indiz dafür wäre, dass SCAMP1 und SCAMP2 nach dem Eintreten in die Zellmembran schnell wieder endozytiert werden.

### **Kolokalisation der SCAMP-Proteine mit zellulären Markern**

Im nächsten Schritt wurden Zellen mit dem jeweiligen SCAMP-Konstrukt und zusätzlich mit spezifischen Zellorganellmarkern für den Golgiapparat (GALT-DsRed:  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase) oder die Zellmembran (PLC $\delta$ 1-Ds-Red, PH-Domäne der Phospholipase C) transfiziert. Eine Kolokalisation beider Proteine war anschließend in der Überlagerung der beiden einzelnen Kanäle erkennbar. In Abb. 4.4.2A erkennt man, dass sich SCAMP1 hauptsächlich in vesikulären Strukturen befand, welche teilweise mit dem Golgimarker überlappen (Abb. 4.4.2 siehe grüne Pfeile). In einigen Zellen konnte die Lokalisation von SCAMP1 in unmittelbarer Nähe der der Membran beobachtet werden. In diesen begrenzten Bereichen kann eine temporäre Lokalisation von SCAMP1 in der Membran nicht ausgeschlossen werden (Abb. 4.4.2, blauer Pfeil). SCAMP2 zeigte eine deutlich stärkere Assoziation mit dem Golgi-Marker und ist vorwiegend nicht in der Zellmembran lokalisiert (Abb. 4.4.2 B).



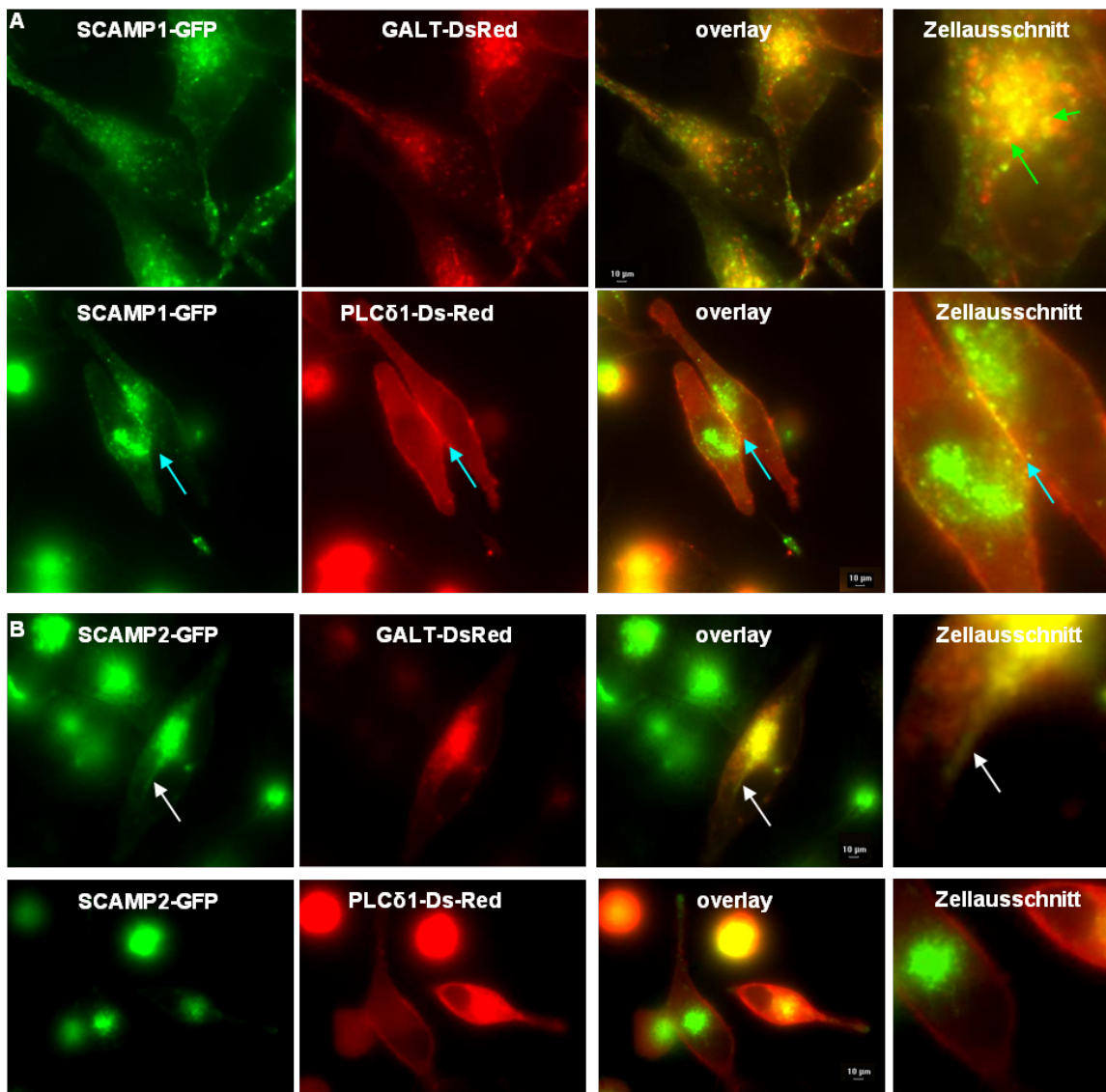


Abbildung 4.4.2: Lokalisation von SCAMP1 und SCAMP2 zusammen mit Markern für den Golgi-Apparat und die Zellmembran  
 SCAMP1 (A) bzw. SCAMP2 -GFP (B) wurden jeweils mit GALT-DsRed (1,4-Galactosyltransferase-DsRed) oder PLC $\delta$ 1-Ds-Red in HeLa Zellen kotransfiziert. Die Analyse erfolgte 24h nach der Transfektion.

SCAMP5 ist ebenfalls im Golgi-Komplex lokalisiert. Es weist jedoch gleichermaßen eine starke Expression in der Membran durch eine auffällige Kolokalisation mit dem Membranmarker auf (Abb. 4.4.3).

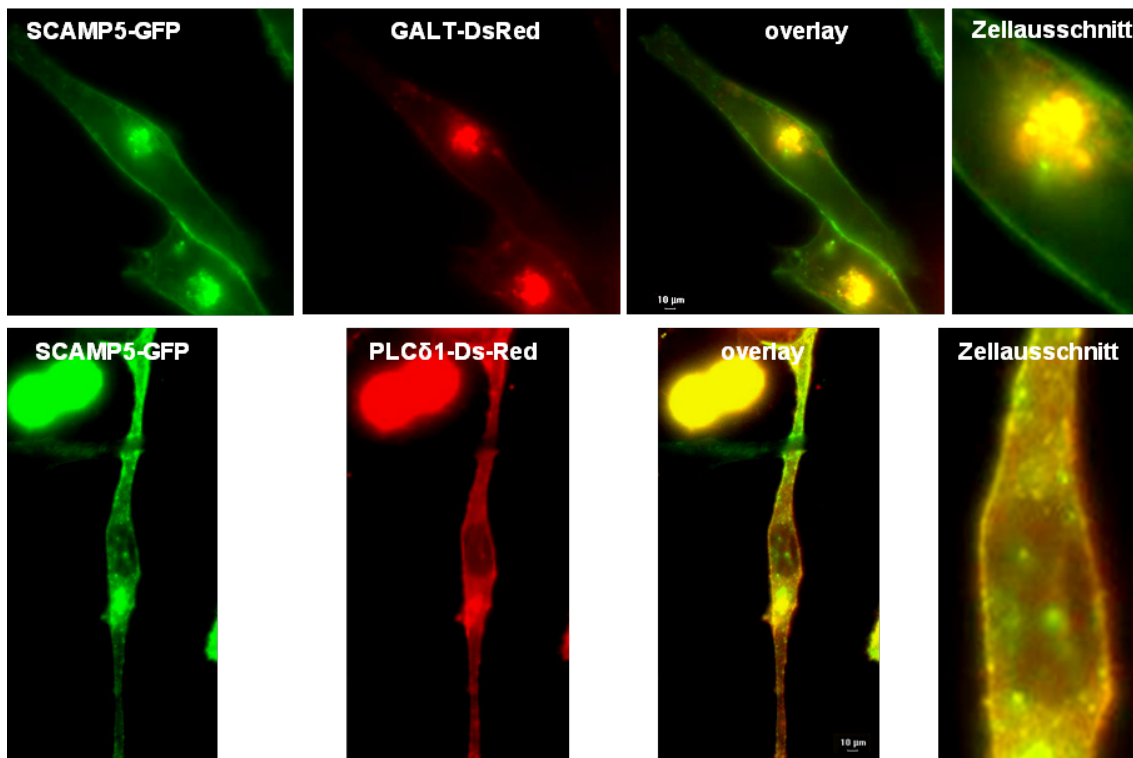


Abbildung 4.4.3: Kolokalisation von SCAMP5 zusammen mit Markern für den Golgi-Apparat und die Zellmembran

SCAMP5-GFP wurde jeweils mit GALT-DsRed oder PLC $\delta$ 1-Ds-Red in HeLa Zellen kotransfiziert. Die Analyse erfolgte 24h nach der Transfektion.

Es konnte mit proteinbiochemischen Methoden (Kapitel 4.3.2) gezeigt werden, dass SCAMP1 und SCAMP5 sowie SCAMP2 und SCAMP5 Heterodimere bilden. Um zu prüfen, ob die Proteine auch in der Zelle kolokalisiert sind, wurden HeLa-Zellen mit SCAMP1- oder SCAMP2 -GFP und SCAMP5-DSRed transfiziert und nach 24 h sowie 48 h analysiert.

Wenn SCAMP1 und SCAMP5 zusammen koexprimiert werden, dann kolokalisieren beide Proteine im Zellplasma (Abb. 4.4.4 A). Für die Einzeltransfektionen der SCAMPs wurde bereits eine Lokalisation im Golgiapparat und für SCAMP5 zusätzlich in der Membran gezeigt (Abb. 4.4.1 - 4.4.2), so dass die Kolokalisation hier sehr wahrscheinlich im Golgi stattfindet. Außerdem erkennt man nach 24h eine starke Kolokalisation in vielen intrazellulären Vesikeln, wobei es sich möglicherweise um Vesikel des Golgi-Netzwerkes oder um Endosomen handelt (Castle und Castle *et al.* 2005). Die Kolokalisation von SCAMP2 mit SCAMP5 ist vorwiegend auf die perinukleäre Region beschränkt (Abb. 4.4.4 B).

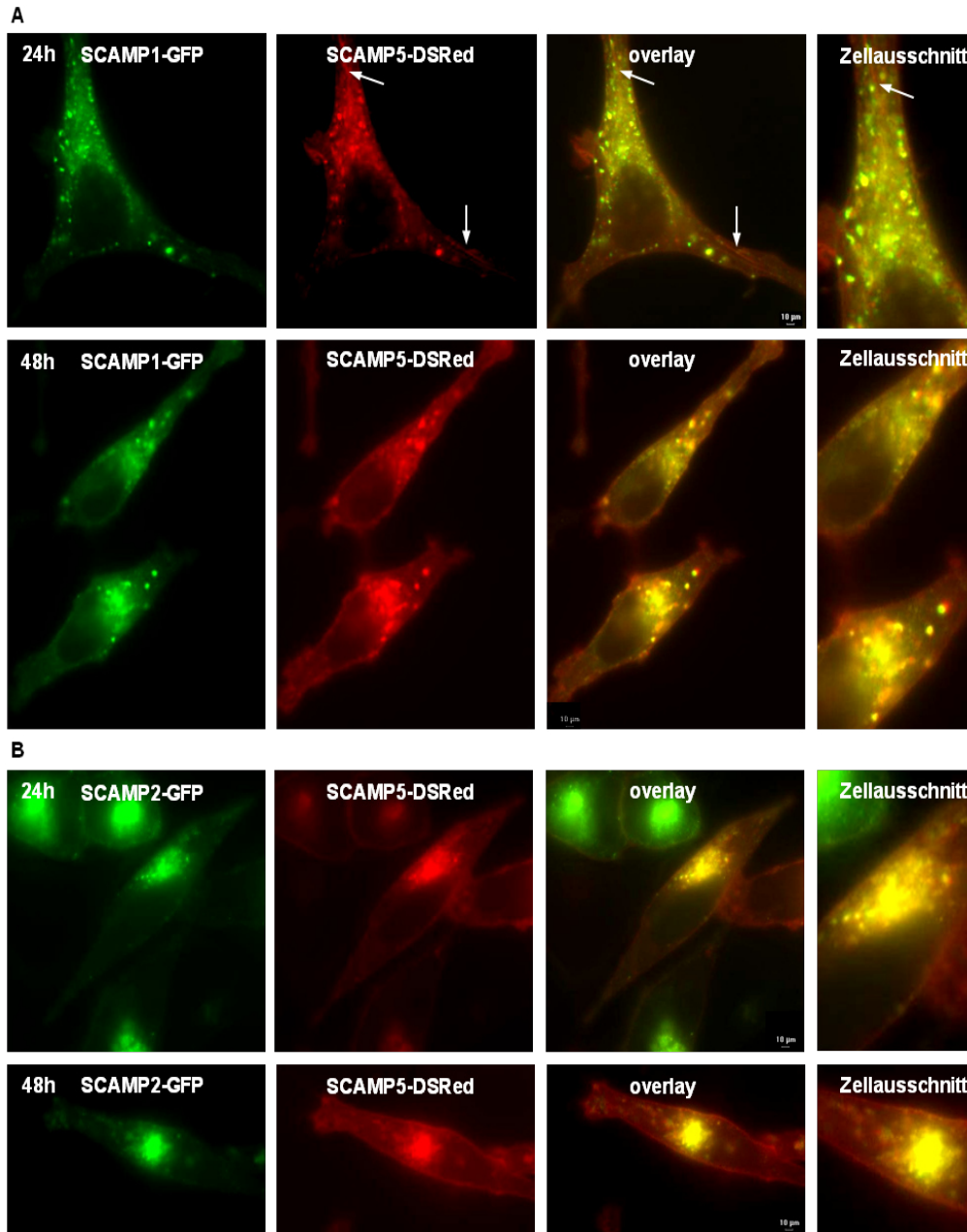


Abbildung 4.4.4: Koloalisation von SCAMP1 und SCAMP2 mit SCAMP5  
 SCAMP1 (A) bzw. SCAMP2 –GFP (B) wurde mit SCAMP5-DsRed in HeLa Zellen kotransfiziert. Die Analyse erfolgte 24h und 48h nach der Transfektion. SCAMP5 ist nach 24h leicht und nach 48h stark in der Membran exprimiert. SCAMP1 und SCAMP2 sind vorwiegend in der Nähe des Kerns und in einigen zellulären Vesikeln exprimiert.

### **Kolokalisation der SCAMP-Proteine mit TASK-1**

Zur Überprüfung der Kolokalisation des  $K_{2P}$ -Kanals TASK-1 mit den SCAMPs wurde vorab die Lokalisation von GFP-TASK-1 untersucht. Der TASK-1-Wildtyp mit C-terminalem EGFP wies nur wenig Zellmembranexpression auf. Aus diesem Grund wurden drei weitere Konstrukte, GFP-TASK-1, GFP-TASK-1 $\Delta$ C5 und GFP-TASK-1 $\Delta$ i20 untersucht (Zuzarte *et al.* 2009).

Bei GFP-TASK-1 wurde das GFP über eine kurze Aminosäuresequenz (Linker YSPLELK F) an den N-Terminus von TASK-1 eingefügt. GFP oder prinzipiell jeder größere Tag kann potentiell die Lokalisation und Funktion von Proteinen verändern. Der hier verwendete Linker sollte die Maskierung des kurzen N-Terminus verhindern sowie den Beginn der ersten Transmembrandomäne von TASK-1 stabilisieren, wodurch eine stärkere Plasmamembranexpression ermöglicht werden sollte. In der Tat zeigen HeLa Zellen, welche mit diesem Konstrukt transfiziert sind, eine relativ starke Membranlokalisation von TASK-1 (Abb. 4.4.5 A)

Bei GFP-TASK-1 $\Delta$ C5 sind die letzten 5 Aminosäuren deletiert. Bei GFP-TASK-1 $\Delta$ i20 sind intern 20 Aminosäuren (Position 80-100) im proximalen C-Terminus deletiert. Bei den Zellen, die mit GFP-TASK-1 $\Delta$ C5 transfiziert wurden, konnte weder nach 24 h noch nach 48 h eine sichtbare Lokalisation des Kanals in der Membran festgestellt werden (Abb. 4.4.5 B). Im Falle von GFP-TASK-1 $\Delta$ i20 wies der Kanal nach 24 h eine geringe Lokalisation in der Membran auf. Nach 48 h war jedoch die Membranlokalisation sehr deutlich (Abb. 4.4.5 C).

GFP-TASK-1 und GFP-TASK-1 $\Delta$ i20 zeigten eine stärkere Oberflächenexpression. Folglich wurden mit diesen Konstrukten weitere Kolokalisationsstudien des Kanals mit den SCAMPs durchgeführt.

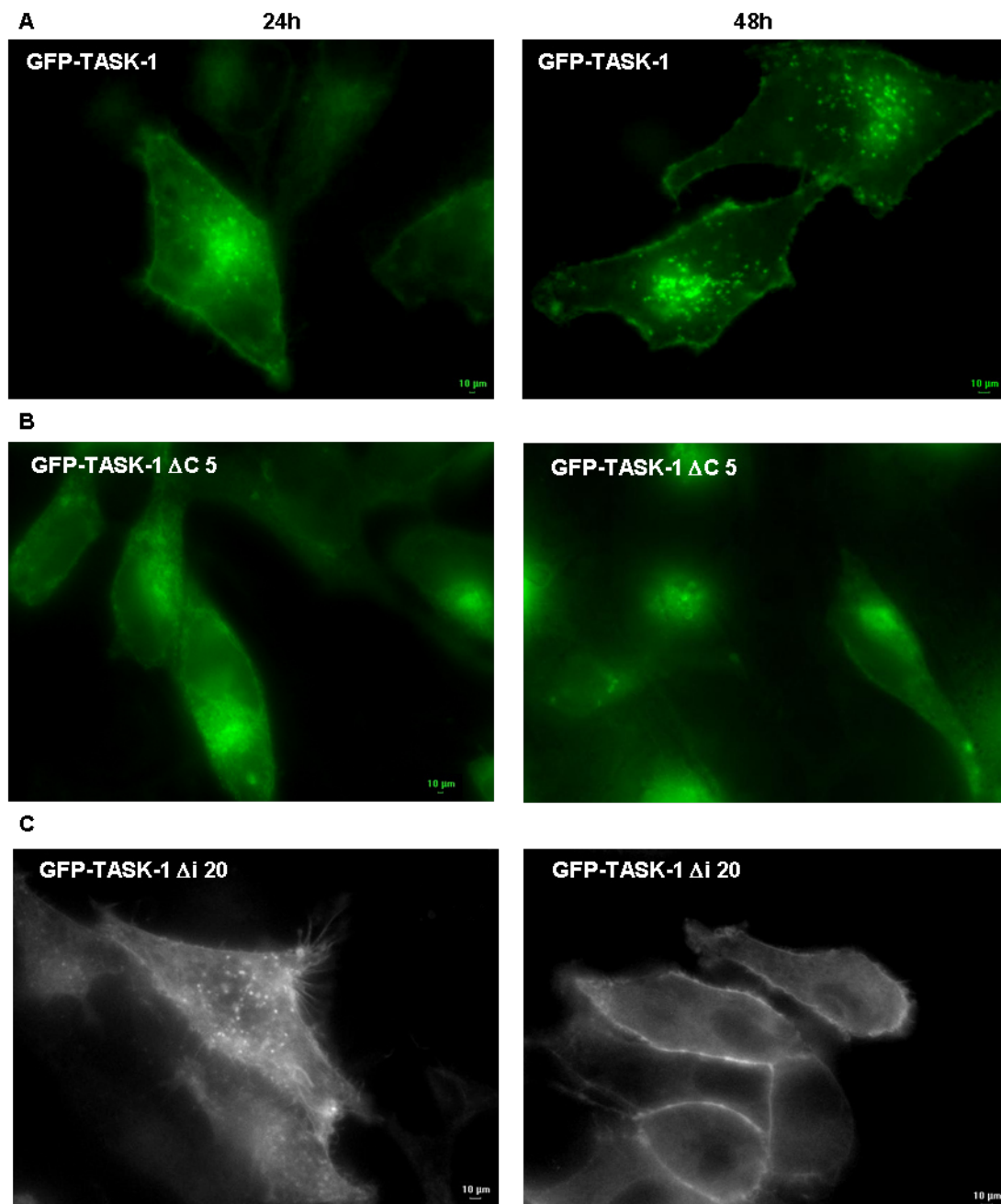


Abbildung 4.4.5: Lokalisation von verschiedenen TASK-1-Konstrukten in HeLa-Zellen  
 HeLa Zellen wurden mit GFP-TASK-1, GFP-TASK-1 $\Delta$ C5 und GFP-TASK-1- $\Delta$ i20 transfiziert und nach 24h und 48h analysiert. GFP-TASK-1 und GFP-TASK-1 $\Delta$ i20 zeigten die stärkste Membranlokalisation



### Kolokalisation von TASK-1 mit SCAMP1

Bei der Koexpression von TASK-1 und SCAMP1 wiesen beide TASK-1-Konstrukte die typische Lokalisation in der Zellmembran auf. Eine Kolokalisation von TASK-1 mit SCAMP1 an der Zellmembran konnte nicht beobachtet werden. Einzelne kolokalisierte Bereiche beschränken sich auf intrazelluläre vesikuläre Strukturen, wobei die Überlappung sowohl nach 24 h als auch nach 48 h als gering einzuschätzen ist (Abb. 4.4.6 A, B).

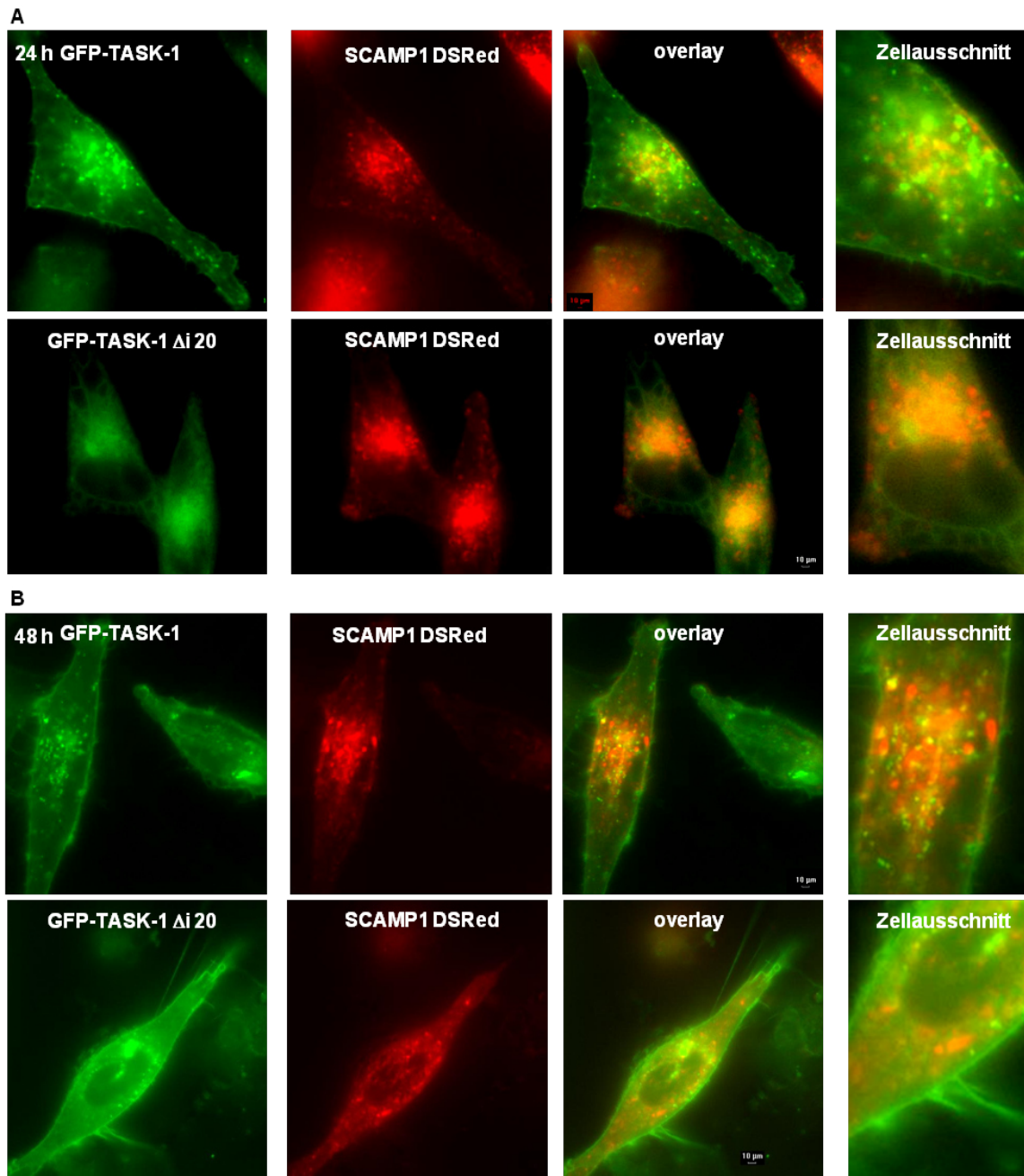


Abbildung 4.4.6: Kolokalisation von SCAMP1 mit TASK-1 in HeLa-Zellen

Die Fluoreszenzmikroskopie der HeLa-Zellen wurde 24h (A) bzw. 48h (B) nach der Kotretransfektion mit den TASK-1-Konstrukten und SCAMP1 durchgeführt. Der weiße Pfeil zeigt eine kleine Region, wo sich SCAMP1 in der Membran befindet.

### Kolokalisation von TASK-1 mit SCAMP2

In Abbildung 4.4.7 sind Zellen dargestellt, die mit SCAMP2 DSRed und den entsprechenden GFP-TASK-1 Konstrukten kotransfiziert wurden. Erkennbar ist eine deutliche Kolokalisation in unmittelbarer Nähe zum Kern, vermutlich dem Golgi-Apparat (vergl. Abb. 4.4.2). Genauso wie SCAMP1 zeigt SCAMP2 keine Kolokalisation mit TASK-1 in der Zellemembran.

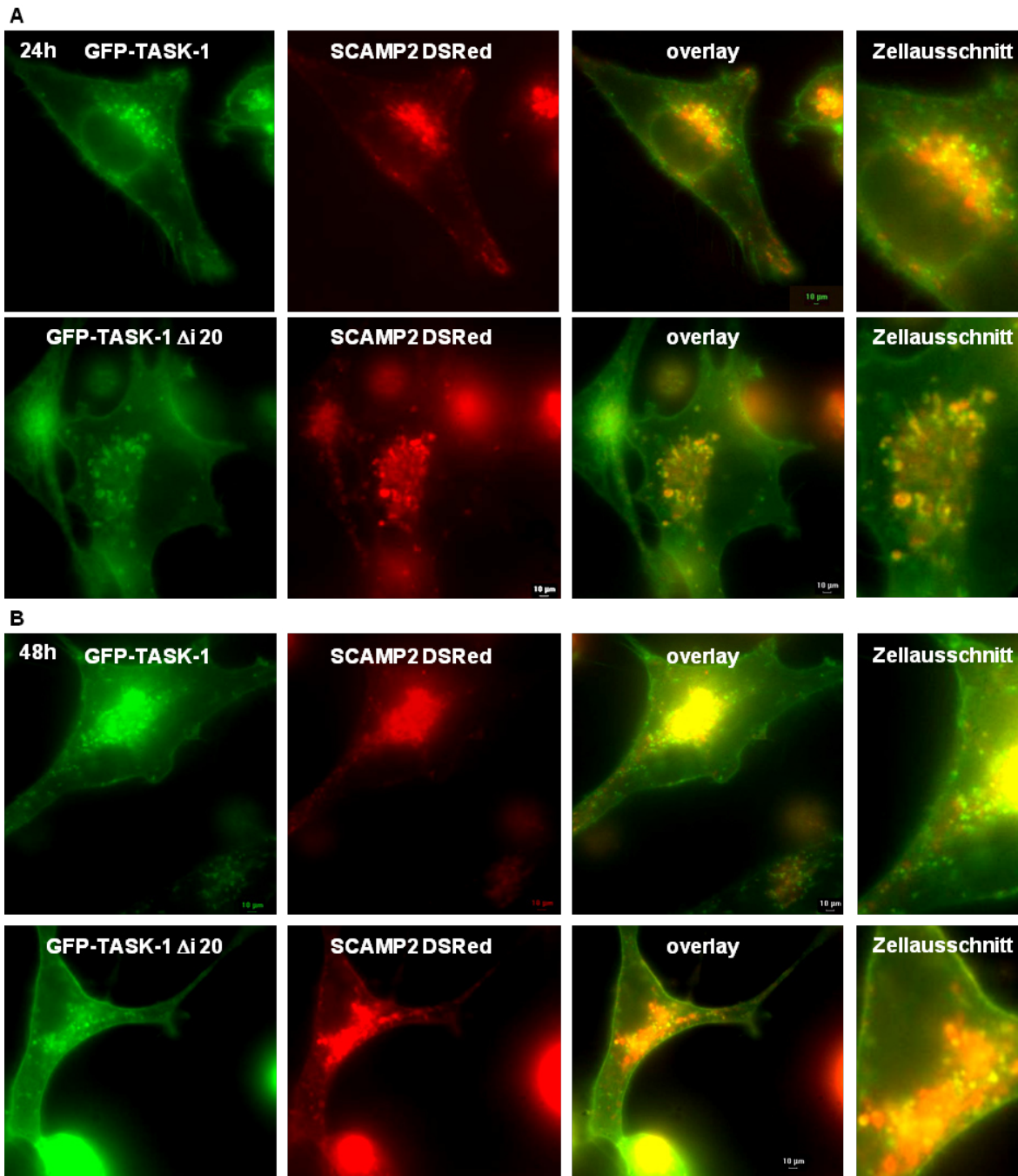


Abbildung 4.4.7: Kolokalisation von SCAMP2 mit TASK-1 in HeLa-Zellen  
Die Fluoreszenzmikroskopie der HeLa-Zellen wurde jeweils 24h (A) bzw. 48h (B) nach ihrer Kotransfektion mit den TASK-1-Konstrukten und SCAMP2 durchgeführt.

### **Kolokalisation von TASK-1 mit SCAMP5**

Die Koexpression von SCAMP5 mit den TASK-1-Konstrukten weist eine deutliche Kolokalisation in der Membran auf (Abb. 4.4.8 A, B). Dies war zu erwarten, da für SCAMP5, im Gegensatz zu SCAMP1 und 2, bereits eine signifikante Membranlokalisation gezeigt wurde (vergl. Abb. 4.4.1). Betrachtet man die intrazelluläre Verteilung der Proteine, so ähneln sich das Expressions- und Kolokalisationsmuster von SCAMP5 und SCAMP1. Die TASK-1-Konstrukte und SCAMP5 sind in vesikulären Strukturen lokalisiert, welche zu einem geringen Teil kolokalisieren (im Gegensatz zu SCAMP2).

Bei den Zellen, die mit GFP-TASK-1 und SCAMP5 DSRed kotransfiziert und nach 24 h mikroskopiert wurden, sieht man bei SCAMP5 wieder die typischen linearen tubulären Strukturen. Interessanterweise erscheint es so, dass GFP-TASK-1 zum Teil dort mit SCAMP5 kolokalisiert ist (Abb. 4.4.8 A, weiße Pfeile).



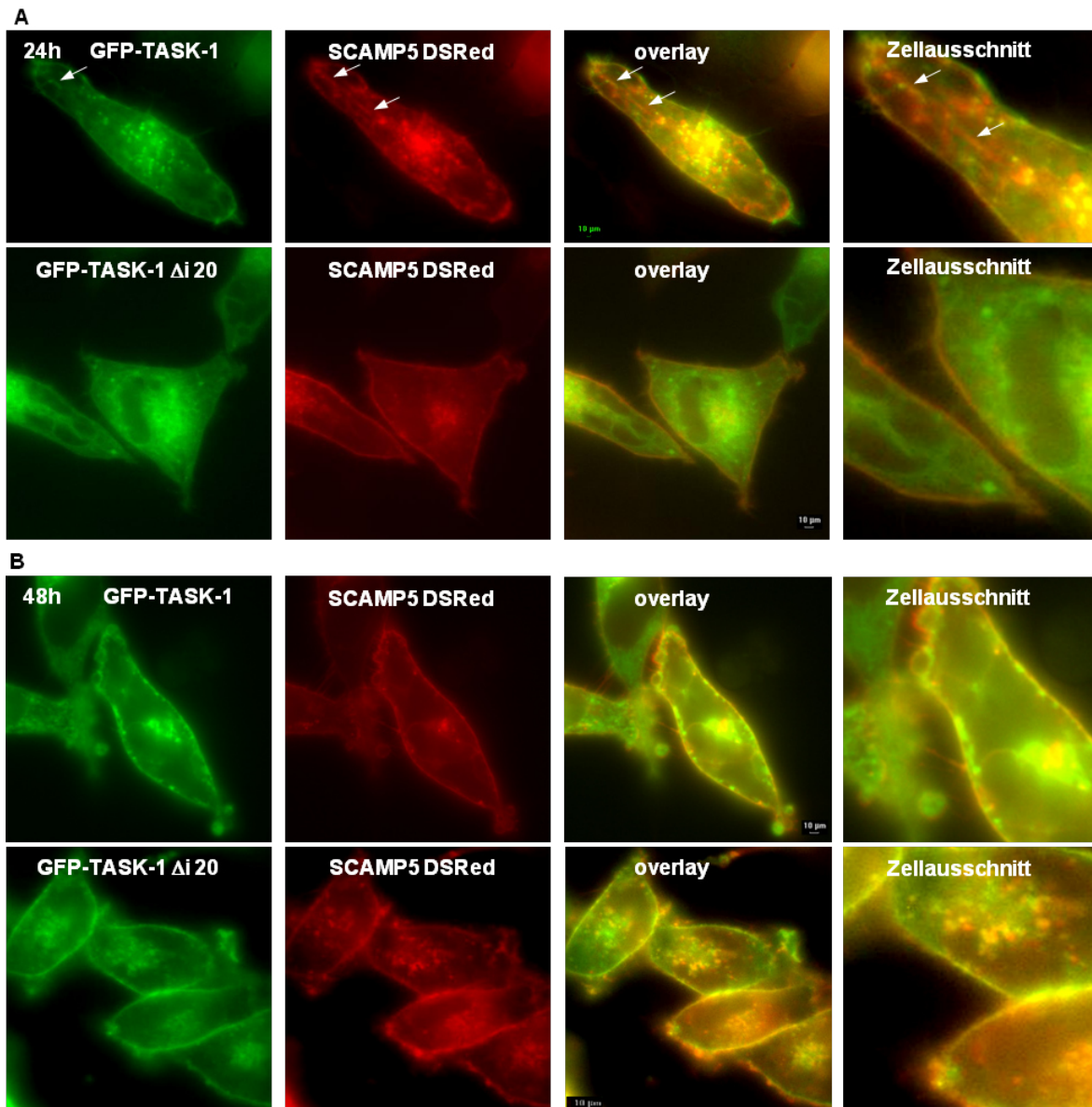


Abbildung 4.4.8: Kolokalisation von SCAMP5 mit TASK-1 in HeLa-Zellen  
 Die Fluoreszenzmikroskopie der HeLa-Zellen wurde 24h (A) bzw. 48h (B) nach der Kotransfektion mit den TASK-1-Konstrukten und SCAMP5 durchgeführt. Die weißen Pfeile zeigen lineare Strukturen von SCAMP5.

## 4.5. Quantifizierung der Endozytoserate

Bei Analyse der Oberflächenexpression (Kapitel 4.2) und in Voltage Clamp Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Stromstärke von TASK-1 durch die SCAMPs auf eine verringerte Oberflächenexpression, vermutlich infolge einer erhöhten Endozytose des Kanals zurückzuführen ist. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde ein weiterer experimenteller Ansatz durchgeführt, der sogenannte „Antikörper Aufnahme Assay“ (siehe Absatz 3.3.4.1), mit dem in gewissem Rahmen die Rate der Endozytose direkt quantifiziert werden kann.

### Analyse der endogenen SCAMP-Expression in COS7 Zellen

Im Antikörper Aufnahme Assay wurden COS7-Zellen verwendet. Vor Durchführung des Assays haben wir zunächst getestet, ob in diesen Zellen SCAMP-Proteine endogen exprimiert werden. Zur Überprüfung der SCAMP Expression in COS7-Zellen wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. In Abbildung 4.5.1 ist erkennbar, dass die Gene von SCAMP1 und SCAMP2 stark und von SCAMP5 eher schwach exprimiert werden. Bei einer endogenen Expression von SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 sollte, wie beim HA-Oberflächenassay, bei Kotransfektion von TASK-1 mit den SCAMPs der Kanal endozytiert werden.

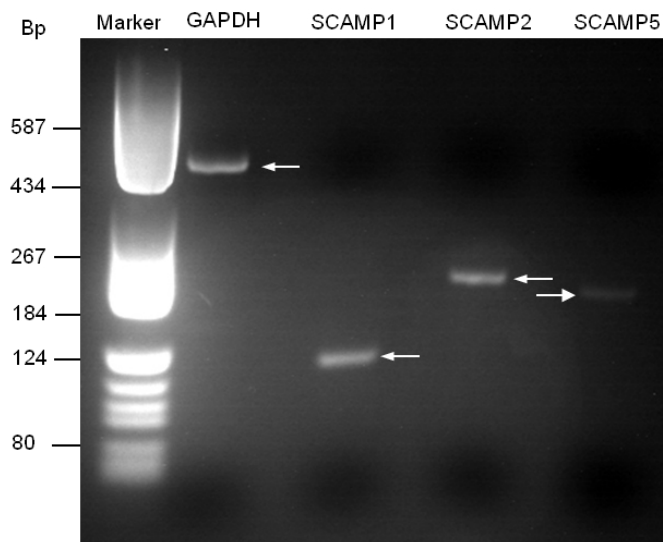


Abbildung 4.5.1: RT-PCR von Cos7 – Zellen  
mRNS von COS7 Zellen wurde per RT-PCR umgeschrieben. Anschließend wurden SCAMP-Transkripte mit entsprechenden Primern amplifiziert. SCAMP1 und SCAMP2 sind stark exprimiert, SCAMP5 eher schwach. Als Kontrolle dient GAPDH, als Marker wurde der  $\Delta$  DNS/Eco47I (AvalI) Marker, 13 von Fermentas verwendet.

Nach Analyse der mRNA-Level der SCAMPs wurden nun die COS7 Zellen direkt auf SCAMP-Proteine untersucht. Die COS7 Zellen wurden dazu lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch einen Western Blot mit SCAMP-spezifische Antikörpern analysiert. Wie in Abbildung 4.5.2 erkennbar ist, konnte sowohl SCAMP1 und SCAMP2, jedoch aber nicht SCAMP5 von den verwendeten Antikörpern detektiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen eine frühere Publikation, wo gezeigt wurde, dass SCAMP1 und SCAMP2, jedoch nicht SCAMP5 auf Proteinlevel in COS-Zellen exprimiert werden (Fernández-Chacón *et al.* 2000).

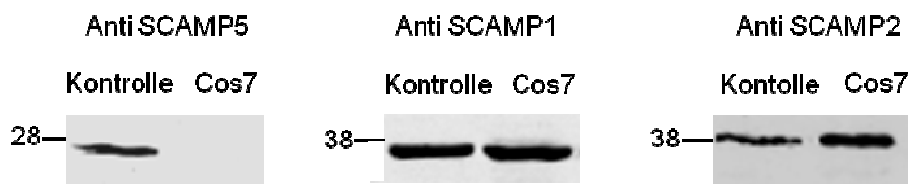


Abbildung 4.5.2: Expression von endogenem SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 in Cos7 Zellen. Als Positivkontrolle wurden Proteinlysate von SCAMP5-His bzw. SCAMP1-myc sowie SCAMP2-myc überexprimierten Zellen verwendet.

Im Antikörper Aufnahme Assay werden Proteine (hier: TASK-1 Kanäle) auf der Zelloberfläche mit einem spezifischen Antikörper markiert, während die Zellen auf Eis verbleiben, um die Endozytose zu inhibieren. Anschließend werden die Zellen auf 37°C erwärmt, wodurch die Endozytose induziert wird. Dabei werden die assoziierten Antikörper internalisiert. Nach einer definierten Zeitspanne werden die Zellen fixiert, wodurch eine Momentaufnahme des Zellzustandes entsteht. Nicht endozytierte Kanäle lassen sich auf der Zelloberfläche mittels eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (hier: Alexa594, rot) detektieren. Internalisierte Kanäle hingegen sind erst nach einer Permeabilisierung der Zellmembran zugänglich und lassen sich mittels eines zweiten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (hier: Alexa488, grün) anschließend selektiv markieren. Wenn TASK-1 alleine in COS7 Zellen exprimiert wurde, trat nur eine relativ geringe Endozytose auf. Dies ist erkennbar durch relativ wenig Grünfärbung nach 30 min (Abb. 4.5.3). Sogar wenn TASK-1 zusammen mit SCAMP1 oder SCAMP2 kotransfiziert wird, ist nach 30 min Inkubation bei 37°C nur ein geringer Anstieg der endozytierten Kanäle (grün markiert) erkennbar. Wurde jedoch TASK-1 zusammen mit SCAMP5 kotransfiziert, so trat eine relativ starke Endozytose von TASK-1 ein, erkennbar an einer starken Grünfärbung nach 30 min (Abb. 4.5.3).

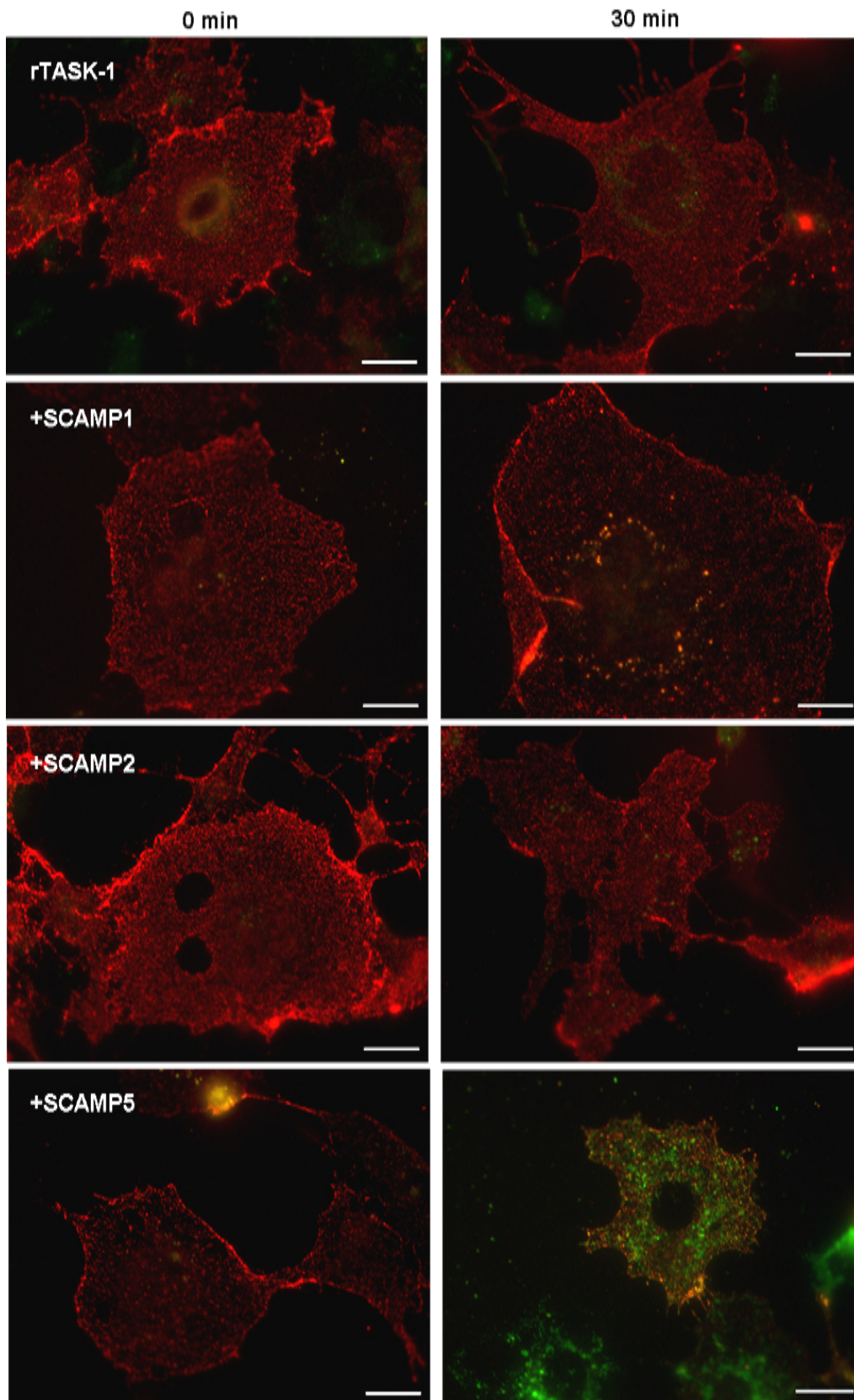


Abbildung 4.5.3: Internalisierung von TASK-1-HA in Abhängigkeit von SCAMPs  
Cos7 Zellen wurden 24 h nach ihrer Transfektion mit Anti-HA Antikörper (Maus) inkubiert. Der rote Anti Maus Antikörper Alexa 594 markiert die Kanäle an der Zelloberfläche. Der grüne Anti-Maus Antikörper Alexa 488 markiert den endozytierten Kanal. Der Marker beträgt 10  $\mu$ m.

Es wurde die Lichtintensität der roten und grünen Antikörperfärbung mit dem Programm NIS-Elements AR Analysis bestimmt, um eine quantitative Aussage über die Rate der Endozytose zu treffen. In Abbildung 4.5.4 ist die relative Lichtintensität (grüne Lichtintensität/ rote Lichtintensität) der markierten TASK-1-Kanäle auf der Zelloberfläche dargestellt. Dabei wird deutlich, dass nur bei einer Kotransfektion mit SCAMP5 nach 30 min ein deutlicher Rückgang von markiertem TASK-1 auf der Membran festzustellen ist (Abb. 4.5.4, Pfeile).

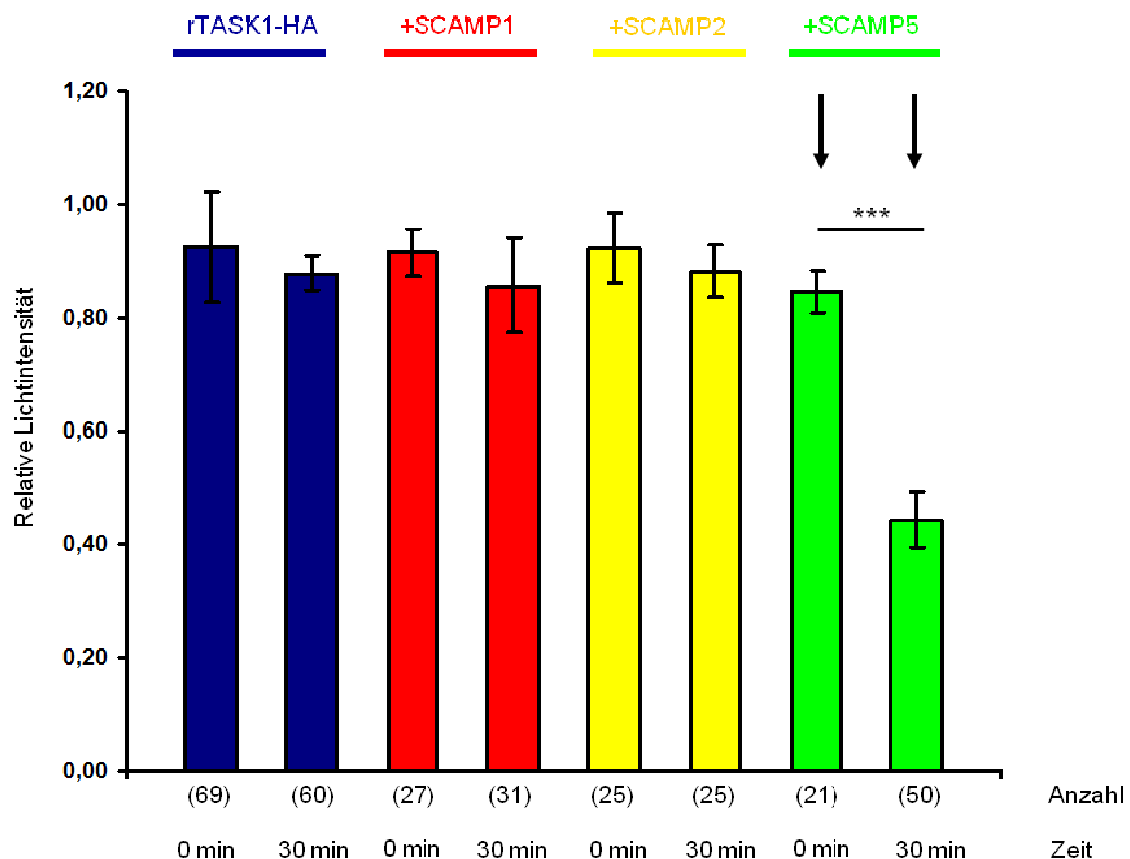


Abbildung 4.5.4: Relative Oberflächenexpression von TASK-1  
Relative Lichtintensität der rTASK-1-HA Kanäle nach 0 und 30 min, die an Oberfläche mit Alexa 594 markiert wurden.

Analog dazu lässt sich der Anstieg der grünen Fluoreszenz infolge der Internalisierung analysieren. Die Quantifizierung der relativen Lichtintensität der endozytierten Kanäle ist in Abbildung 4.5.5 dargestellt. Auch in diesem Graf wurde wie in Abbildung 4.5.4 die relative Lichtintensität und damit das Verhältnis zwischen grüner und roter Lichtintensität aufgetragen.

Es ist erkennbar, dass TASK-1 alleine exprimiert und nach 30 min nur relativ schwach endozytiert wird. Die Endozytoserate von TASK-1 nimmt bei der Koexpression von SCAMP1 und 2 nur schwach zu. Die SCAMP5 Koexpression

hingegen steigert die Endozytose relativ stark, ca. 55% der Kanäle wurden endozytiert (Abb. 4.5.5, Pfeile).

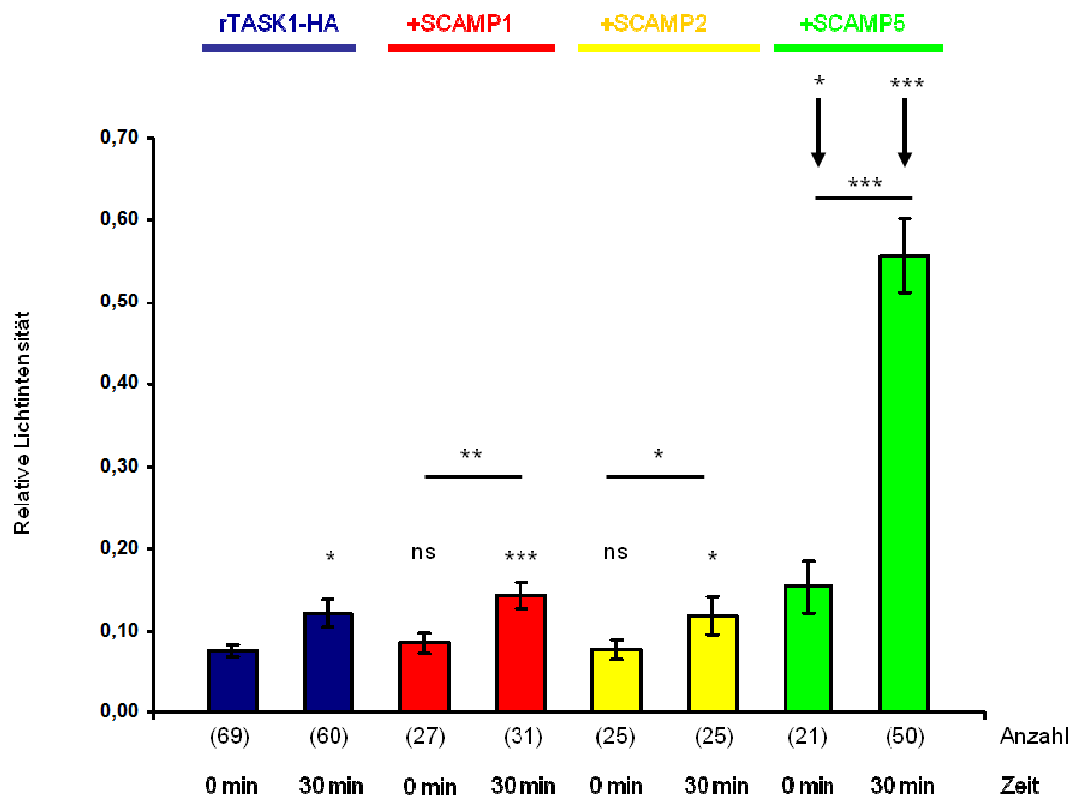


Abbildung 4.5.5: Relative endozytierte TASK-1-Kanäle

Dargestellt ist die relative Lichtintensität der endozytierten rTASK-1-HA Kanäle nach 0 und 30 min, die mit Alexa 488 markiert wurden.

Die Tatsache, dass COS7-Zellen endogen SCAMP1 und SCAMP2 aber kein SCAMP5 exprimieren (Fernández-Chacón *et al.* 2000, vorliegende Arbeit) und die Beobachtung, dass eine starke Endozytose von TASK-1 nur bei einer Kotransfektion mit SCAMP5 auftritt, unterstützt die Hypothese, dass SCAMP5 als Adapterprotein zwischen TASK-1 und SCAMP1 oder SCAMP2 fungieren könnte.

## 5. Diskussion

### Regulation der Expression von TASK-1 an der Zelloberfläche

K<sub>2</sub>P-Kanäle wurden bisher in der Literatur oft vereinfacht als Hintergrund- oder als Leck-Kanäle („leak channels“) betrachtet. Mittlerweile hat man erkannt, dass K<sub>2</sub>P-Kanäle bei der Einstellung und Modulation des Ruhemembranpotentials sowie bei der Modulation des Aktionspotentials beteiligt sind (Renigunta *et al.* 2014). Zusammen mit ihrem selektiven und differentiellen Expressionsmuster sind K<sub>2</sub>P-Kanäle daher wichtige Akteure in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen (Bittner *et al.* 2010). TASK-1 ist ein Vertreter der K<sub>2</sub>P-Kanäle, über dessen Regulation der Endozytose nur wenig bekannt ist. In der Literatur wurden bereits mehrere Interaktionspartner von TASK-1 beschrieben. Einer dieser Interaktionspartner ist das Protein 14-3-3, welches an das Retentions-Motiv KRR bindet, dieses abschirmt und es dem Kanal so ermöglicht, an die Zellmembran zu gelangen (Zuzarte *et al.* 2009, Rajan *et al.* 2002, O’Kelly *et al.* 2002). Ein weiteres Protein, welches Einfluss auf die Zellmembranexpression von TASK-1 nimmt, ist p11 (Girard *et al.* 2002). Dieses Protein wirkt, im Gegensatz zu 14-3-3, als Retentionsfaktor, welches den Kanal im Endoplasmatischen Retikulum zurückhält (Renigunta *et al.* 2006). 14-3-3 und p11 beeinflussen die Oberflächenexpression von TASK-1, indem der vorwärtsgerichtete Transport reguliert wird. Der retrograde Transport, insbesondere die Endozytose von K<sub>2</sub>P-Kanälen wurde hingegen bisher wenig untersucht (O’Kelly *et al.* 2014). Für einen weiteren K<sub>2</sub>P-Kanal, TWIK-1, wurde beschrieben, dass dieser K<sub>2</sub>P-Kanal über einen dynaminabhängigen Mechanismus endozytiert wird (Felicangeli *et al.* 2010). Mant *et al.* beschrieb 2013, dass TASK-1 und TASK-3 ebenfalls über einen Dynamin abhängigen Mechanismus endozytiert werden. In dieser Studie wurde weiter gezeigt, dass die Kanäle nach der Endozytose in frühen Endosomen lokalisiert sind. Bis zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch nicht geklärt, ob es sich bei der Endozytose um eine clathrinabhängige oder um eine clathrinunabhängige Endozytose handelt. Eine aktuelle Studie über einen weiteren Interaktionspartner von TASK-1 zeigte deutliche Hinweise auf eine Clathrin-vermittelte Endozytose von TASK-1 (Renigunta *et al.* 2014). In dieser Studie wurde das erste Mal beschrieben, dass ein Kaliumkanal durch ein SNARE-Protein (Syntaxin-8) über



die Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Endozytoserate von TASK-1 verringert wird, wenn Endozytosesignale sowohl in Syntaxin-8 als auch in TASK-1 mutiert werden, was auf einen kooperativen Endozytose-Mechanismus hindeutet. Die Aktivität von TASK-1 wird also durch verschiedene Proteine reguliert, indem diese an den Kanal direkt oder indirekt binden und so den Vorwärts- oder Rückwärtstransport und damit die Oberflächenexpression beeinflussen. Die Analyse von potentiellen Bindungspartnern von TASK-1 lässt daher Rückschlüsse auf dessen Regulation zu. Mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Assay (Yeast-Two-Hybrid assay, Y2H) wurde SCAMP5 als ein weiterer Interaktionspartner für TASK-1 identifiziert und dessen Einfluss auf TASK-1 in der hier vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

### **SCAMP5 als neuer Interaktionspartner von TASK-1**

SCAMP5 gehört zu den Secretory carrier membrane proteins (SCAMPs), welche Homo- sowie Heterodimere bilden können (Wu *et al.* 1997). Die SCAMPs weisen eine differentielle Expression im Organismus auf, denn während SCAMP1, SCAMP2, SCAMP3 und SCAMP4 ubiquitär exprimiert werden, scheint SCAMP5 ausschließlich im Gehirn vorzukommen (Castle und Castle 2005, Lin, *et al.* 2005). TASK-1 wird ebenfalls im Gehirn exprimiert (Zuzarte *et al.* 2009). Aus diesem Grund wurde im Y2H-Assay überprüft, ob SCAMP1 und SCAMP2, ähnlich wie SCAMP5, mit TASK-1 direkt interagieren. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.1.1). Weiterhin konnte keine Interaktion von SCAMP5 mit TASK-3 und TASK-5, beides strukturell und phylogenetisch enge Verwandte von TASK-1, festgestellt werden. Die Interaktion von TASK-1 mit SCAMP5 scheint daher spezifisch zu sein.

Um einen funktionellen Effekt von SCAMPs auf TASK-1 zu untersuchen, wurden Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messungen (Two-Electrode-Voltage Clamp, TEVC) durchgeführt.

In der Strommessung konnte ein stromreduzierender Effekt von TASK-1 durch SCAMP5, aber auch durch SCAMP1 und SCAMP2 nachgewiesen werden (Abb. 4.2.1.1). In der Strommessung wird untersucht, wie sich der Stromfluss, also die Anzahl der Ionen pro Zeiteinheit, über die Membran verhält. Dieser



Strom ist von mehreren Faktoren abhängig: Der Einzelkanalleitfähigkeit ( $\gamma$ ) sowie die Öffnungswahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) des Kanals (Gating) und der Anzahl ( $n$ ) der Kanäle auf der Zelloberfläche. Die Oberflächenexpression eines Proteins wird im Wesentlichen durch den Transport zur und den Abtransport von der Membran reguliert (Trafficking). Während ein Gating-Effekt erst durch aufwendige Einzelkanalmessungen nachweisbar ist, lässt sich die Oberflächenexpression beispielsweise durch einen HA-Oberflächen Assay quantifizieren. Dabei wird das zu untersuchende Membranprotein auf der extrazellulären Seite mit einem HA-Tag versehen und dessen Expression auf der Zelloberfläche durch Anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Es konnte so nachgewiesen werden, dass die Koexpression von TASK-1 mit SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 die Anzahl der Kanäle an der Zelloberfläche reduziert (Abb. 4.2.1.3).

Des Weiteren wurde bereits publiziert, dass die SCAMPs mit einer Reihe von weiteren Proteinen eine Interaktion eingehen, beispielsweise den Monoamin-Transportern, den Na-K-2Cl Co-Transportern und die  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauscher wie NHE5 sowie NHE7 (Matthies *et al.* 2009, Fjorback *et al.* 2011, Müller *et al.* 2006, Zaarour *et al.* 2010, Diering *et al.* 2009, Lin *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SCAMPs die Stromstärke von TASK-1, aber nicht die Stromstärke von TASK-3 reduzieren können. Desweiteren konnten die SCAMPs den Strom von zwei weiteren Kaliumkanälen TREK-1a (ein  $\text{K}_{2P}$ -Kanal, der nicht zur TASK-Familie gehört) und Kir2.1 nicht reduzieren (Abb. 4.2.2.2 und 4.2.2.3). Das macht deutlich, dass die SCAMPs den Strom von TASK-1 spezifisch reduzieren, dass es sich also nicht um eine generelle Wirkung auf Ionenkanäle oder auf die clathrinvermittelte Endozytose handelt.

### **Untersuchung der zytoplasmatischen Regionen von SCAMPs**

Der topologische Aufbau der SCAMPs mit ihren N-Termini, den vier Transmembrandomänen und dem C-Terminus ähnelt den  $\text{K}_{2P}$ -Kanälen. Im Fall von TASK-1 binden viele Interaktionspartner am C-Terminus des Kanals (Renigunta *et al.* 2006, Enyedi und Czirják 2010, Kilisch *et al.* 2015). Des Weiteren ist beschrieben, dass der NHE5  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauscher an den N- und

C- Terminus von SCAMP2 bindet (Diering *et al.* 2009). Wir vermuteten zunächst, dass der C-Terminus der SCAMPs eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem Kanal spielt. Aus diesem Grund wurde zuerst der C-Terminus von SCAMP1 und SCAMP5 deletiert und der Einfluss dieser Konstrukte auf TASK-1 Ströme analysiert. Nach Entfernung des C-Terminus war die Reduzierung der Stromamplitude von TASK-1 jedoch unverändert (Abb. 4.2.1.5).

In der Literatur wird beschrieben, dass das E-Peptid der SCAMPs an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub> bzw. PIP<sub>2</sub>] binden kann und an der Exozytose beteiligt ist (Liu *et al.* 2002, Liao *et al.* 2007). Wir vermuteten daher, dass möglicherweise die SCAMPs auf diese Weise die Exozytose und damit die Oberflächenexpression des Kanals beeinflussen könnten. Des Weiteren ist das E-Peptid der SCAMPs eine wichtige Bindestelle für den NHE7 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Austauscher (Lin *et al.* 2005); demzufolge besteht die Möglichkeit, dass das E-Peptid auch mit TASK-1 interagieren könnte. Die Deletion des E-Peptids hatte jedoch keinen Einfluss auf die Reduzierung des Stroms von TASK-1 (Abb. 4.2.1.5 und Abb.4.2.1.14). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass diese Bereiche (C-Terminus, E-Peptid) für den stromreduzierenden Effekt der SCAMPs nicht relevant sind.

In weiterführenden Experimenten wurde als nächstes der N-Terminus von SCAMP5 sowie eine Schleifensequenz (Position 125-146, zwischen Transmembrandomäne 3 und 4) daraufhin überprüft, ob er für die Interaktion mit TASK-1 in Frage kommt. Der N-Terminus von SCAMP5 weist keine NPF Motive auf, enthält aber prolinreiche Sequenzen, welche dafür bekannt sind SH3 (Src homology 3) - Bindemotive zu sein (Wenig *et al.* 1995). Die Deletion des kompletten N-Terminus sowie die Schleifensequenz von SCAMP5 hatten jedoch keinen Einfluss auf die Reduzierung der Stromstärke von TASK-1, was zeigt, dass die prolinreichen Sequenzen von SCAMP5 nicht notwendig für die Interaktion mit TASK-1 sind (Abb. 4.2.14). Mit der Mutante SCAMP $\Delta$ NEC wurden alle zytoplasmatischen Regionen von SCAMP5 deletiert. Ebenso wies auch diese Mutante den gleichen stromreduzierenden Effekt wie der Wildtyp auf (Abb. 4.2.1.14). Diese Ergebnisse zeigen, dass es uns nicht gelungen ist, die Abschnitte in SCAMP5 zu ermitteln, die für die Interaktion von SCAMP5 mit

TASK-1 verantwortlich sind. Wir vermuten, dass die Transmembrandomänen von SCAMP5 und TASK-1 miteinander interagieren können und die zytoplasmatischen Regionen von SCAMP5 nicht wichtig für die Interaktion mit TASK-1 sind.

### **NPF-repeats sind verantwortlich für die Endozytose von TASK-1**

Im Gegensatz zum kurzen N-Terminus von SCAMP5 befinden sich in den längeren N-Termini von SCAMP1 und SCAMP2 zusätzlich zu der prolinreichen Sequenz NPF-repeats (Asparagin-Prolin-Phenylalanin). Die NPFs spielen bei Endozytoseprozessen eine wichtige Rolle (Fernández-Chacón *et al.* 2000). Nach Entfernung des vollständigen N-Terminus von SCAMP1 und SCAMP2 wurde der Strom des Kanals nicht mehr reduziert (Abb. 4.2.1.5). Zur Klärung der Frage, welche der beiden Sequenzen, NPF-repeats oder prolinreichen Sequenz, für den stromreduzierenden Effekt verantwortlich ist, wurden selektiv die NPFs deletiert. Dabei zeigte sich, dass diese Deletion ausreicht, um die Reduktion der Stromstärke von TASK-1 zu verhindern (Abb. 4.2.1.6). Bestätigend konnte im HA-Oberflächenassay gezeigt werden, dass bei einer Koexpression von TASK-1 mit den Mutanten keine Reduzierung der Oberflächenexpression erfolgte (Abb. 4.2.1.7).

Die NPF-repeats sind wichtig für die Interaktion mit einer Vielzahl an Proteinen, die eine oder mehrere EH-Domänen enthalten. Diese EH-Domänen-Proteine sind bekannt dafür, dass sie an der Endozytose beteiligt sind (Fernández-Chacón *et al.* 2000, Guilherme *et al.* 2004). Um zu prüfen, ob die Endozytose von TASK-1 durch SCAMPs beeinflusst wird, wurden chemische Inhibitoren der Endozytose wie Dynasore und Nystatin eingesetzt. Nystatin, welches die Lipid-Raft-Caveolae-abhängige Endozytose hemmt, hatte keinen Effekt auf die Reduzierung der Stromamplitude von TASK-1 durch die SCAMPs (Abb. 4.2.1.8). Dynasore hingegen inhibiert sowohl die clathrinabhängige als auch die caveolinabhängige Endozytose, in dem es die GTPasen Dynamin 1 und Dynamin 2 blockiert. Für Dynasore wurde bereits beschrieben, dass es die Endozytose der TASK- Kanäle hemmt (Mant *et al.* 2013). In unseren Strommessungen konnte Dynasore den Effekt der SCAMPs aufheben (Abb. 4.2.1.9). Da Nystatin keinen Effekt zeigte und Dynasore die Reduktion des

TASK-1-Stromes durch die SCAMPs verhinderte, ist es sehr wahrscheinlich, dass die SCAMPs die clathrinvermittelte Endozytose von TASK-1 beeinflussen. Um das zu untermauern, wurde eine Mutante des endozytose-assoziierten Proteins AP180 eingesetzt (AP180C), welches kompetitiv die Endozytose inhibiert (Ford *et al.* 2001 und Renigunta *et al.* 2014). Bei Koexpression von TASK-1 mit den SCAMPs und der AP180C Mutante war der stromreduzierende Effekt der SCAMPs verringert (Abb. 4.2.1.10). Dies unterstützt zusätzlich die Annahme, dass der Effekt der SCAMPs auf TASK-1 durch eine erhöhte Endozytoserate vermittelt wird, wobei es sich dabei sehr wahrscheinlich um clathrinabhängige Endozytose handelt.

Zur genaueren Untersuchung des Effekts der SCAMPs auf die Endozytose wurde ein weiterer Ansatz gewählt, der sogenannte Antikörper Aufnahme Assay. Bei diesem kann die Menge der von der Zellmembran aufgenommenen Kanäle direkt bestimmt werden. Der Assay bestätigte, dass alle drei SCAMPs die Endozytose des Kanals induzieren können (Abb. 4.5.5). Interessanterweise ist bei SCAMP5 die Endozytoserate ca. dreimal höher als bei SCAMP1 oder SCAMP2. Dahingegen hatten Strommessungen gezeigt, dass alle SCAMPs einen vergleichbar starken Effekt auf den Strom von TASK-1 haben. Möglicherweise ist, abhängig vom verwendeten Zellsystem, der für die SCAMP-vermittelte Stromreduzierung verantwortliche Mechanismus komplexer als bisher angenommen. Wir vermuteten daher, dass dabei die Heterodimerisierung der SCAMPs eine Rolle spielen könnte. Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine RT-PCR in COS7-Zellen durchgeführt sowie die Proteinexpression mittels SCAMP spezifischen Antikörpern getestet (Abb. 4.5.1 und 4.5.2). Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigten die bereits publizierten Daten, dass SCAMP1 und 2 in COS7-Zellen exprimiert werden, SCAMP5 jedoch nicht (Fernández-Chacón *et al.*, 2000). Eine plausible Erklärung für die geringe Endozytose von TASK-1 bei Koexpression mit SCAMP1 und 2 (verglichen mit SCAMP5) in COS7-Zellen ist das Fehlen von SCAMP5 als Adapterprotein zwischen TASK-1 und SCAMP1 sowie SCAMP2. Dies erklärt auch deren fehlende direkte Interaktion mit TASK-1 im Y2H-Assay. In Oozyten hingegen ist SCAMP5 endogen exprimiert (Abb. 4.2.1.2), wodurch die Expression von SCAMP1 oder SCAMP2 alleine ausreicht, um die

Oberflächenexpression von TASK-1 zu reduzieren, da hier endogenes SCAMP5 als Adapter fungieren kann.

### **Proteinbiochemische Untersuchung der Interaktion zwischen SCAMPs und TASK-1**

Zur genaueren Analyse der Protein-Protein-Interaktionen zwischen TASK-1 und den SCAMPs wurden proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt, mit dem Ziel, eine direkte Interaktion in Säugerzellen zu zeigen. Als erster Ansatz wurde der GST- Pull Down gewählt, bei dem eine kurze Domäne des Prey-Proteins an GST fusioniert ist. In einigen Publikationen wurde gezeigt, dass der C-Terminus von TASK-1 für die Bindung an Interaktionspartnern wichtig ist (Zuzarte *et al.* 2009, Renigunta *et al.* 2006, Renigunta *et al.* 2014). Daher wurde der C-Terminus von TASK-1 mit GST fusioniert und untersucht, ob die SCAMPs daran binden können. Jedoch konnte keine Interaktion des C-Terminus von TASK-1 mit SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 nachgewiesen werden (Abb. 4.3.1.1 C-D). Obwohl dieses GST-TASK-1 Fusionsprotein bereits erfolgreich in GST-Pulldown-Assays eingesetzt wurde (Renigunta *et al.* 2006), scheint hier der isolierte C-Terminus nicht auszureichen, um mit den SCAMPs zu interagieren.

In den Strommessungen waren die NPF-repeats im N-Terminus der SCAMPs ausschlaggebend für den stromreduzierenden Effekt, möglicherweise ist der N-Terminus für die direkte Interaktion mit TASK-1 notwendig. Daher wurde der N-Terminus von SCAMP1 und 2 an GST fusioniert und die Interaktion mit TASK-1 untersucht. Beide Konstrukte zeigten jedoch keine Interaktion mit TASK-1 (Abb. 4.3.1.1 A-B). Falsch-negative Ergebnisse in GST- Pull Downs sind jedoch häufig auf die nicht-physiologische Struktur und die geringe Größe des Prey-Proteins zurückzuführen und sind daher kritisch zu beurteilen.

### **SCAMP5 als Adapterprotein zwischen TASK-1 und SCAMP1 oder SCAMP2**

Für die Interpretation unserer Experimente ist es wichtig zu wissen, in welchem Ausmaß SCAMP Proteine Homo- oder Heterodimere bilden können (Wu *et al.* 1997 und Lin *et al.* 2005). Für die Untersuchung der Homo- und Heterodimerisierung wurde ein Proteininteraktions-Assay, der His-Pull Down, verwendet. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine in voller Länge exprimiert, was eher den physiologischen Bedingungen entspricht. Dieser Assay zeigte, dass SCAMP5 sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit SCAMP1 und SCAMP2 bildet (Abb. 4.3.2.1 A-D), was bereits publizierte Ergebnisse ergänzte (Wu *et al.* 1997). Im weiteren Verlauf wurde untersucht, wie relevant der N-Terminus von SCAMP5 für die Homo- und Heterodimerisierung ist. Dazu wurde SCAMP5 mit deletiertem N-Terminus im His-Pull Down eingesetzt. Diese Mutante, SCAMP5- $\Delta$ -N-Terminus, ist fähig SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 zu präzipitieren (Abb. 4.3.2.3). Zusätzlich geht aus den Strommessungen hervor, dass die SCAMP5 Mutanten, deren zytoplasmatischer Teil deletiert wurde, den Strom von TASK-1 im gleichen Maße reduzieren wie der Wildtyp (Abb. 4.2.1.14). Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Bereiche nicht essentiell für die Homo- und Heterodimerisierung sind.

In den Proteininteraktions-Assays sowie im Y2H-Assay konnte keine direkte Interaktion von TASK-1 mit SCAMP1 oder SCAMP2 festgestellt werden. Auch im Antikörper Aufnahme Assay in COS7 Zellen hat sich gezeigt, dass TASK-1 nur dann stark endozytiert wurde, wenn TASK-1 zusammen mit SCAMP5 transfiziert wurde. Da mit spezifischen Antikörpern in COS7 Zellen nur SCAMP1 und SCAMP2 nachweisbar waren, scheinen SCAMP1 und SCAMP2 nur dann TASK-1 endozytieren zu können, wenn SCAMP5 als potentielles Adapterprotein vorhanden ist. Dieses Ergebnis stützt unsere Sandwich Hypothese, die besagt, dass SCAMP1 und SCAMP2 nur über SCAMP5 einen Effekt auf TASK-1 ausüben können (Abb. 4.2.1.11).

Damit die Sandwich Hypothese in Oozyten, die natives SCAMP5 exprimieren, überprüft werden kann, wurden in den Strommessungen die Mutanten SCAMP1- $\Delta$ -NPF und/oder SCAMP2- $\Delta$ -NPF zusammen mit SCAMP5 und TASK-1 koexprimiert. Dies dient dem Nachweis, ob SCAMP5 als

Adapterprotein fungiert. Wie sich in den Strommessungen zeigte, fiel die Reduzierung der Stromstärke von TASK-1 am geringsten aus, wenn SCAMP5 zusammen mit dem SCAMP1- $\Delta$ -NPF und SCAMP2- $\Delta$ -NPF koexprimiert wurde (Abb. 4.2.1.12). Dies bestätigt die Vermutung, dass SCAMP5 SCAMP1 oder 2 benötigt, um die TASK-1-Strom zu verringern. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass SCAMP5 als Adapterprotein zwischen TASK-1 und SCAMP1 bzw. SCAMP2 fungiert. Um diese Theorie weiter zu verfolgen, müsste in Oozyten ein Knockdown von endogenem SCAMP5 durchgeführt werden. Dann sollte bei einer Koinjektion von TASK-1 mit SCAMP1 der Strom des Kanals nicht mehr reduziert werden. Da die  $\Delta$ -NPF Mutanten den Effekt von SCAMP5 auf TASK-1 nicht vollständig blockieren, scheint SCAMP5 noch in gewissem Ausmaß mit den endogenen Wildtypen von SCAMP1 und SCAMP2 interagieren zu können. Des Weiteren könnte auch eine Interaktion von SCAMP5 mit endogenem SCAMP3 verantwortlich für die Verringerung des TASK-1 Stromes sein. Denn auch SCAMP3 besitzt wie in Punkt 1.5 dieser Arbeit beschrieben NPF-repeats im N-Terminus und käme als weiterer Interaktionspartner in Frage.

### **Lokalisierung der SCAMPs in verschiedenen Zellkompartimenten**

Wenn SCAMP5 als Adapterprotein zwischen TASK-1 und SCAMP1 oder SCAMP2 fungiert, müsste es in bestimmten Zellkompartimenten kolokalisiert sein. Es wurde bereits beschrieben, dass SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP3 in perinukleären Membranen lokalisiert sind (Castle und Castle 2005). Weiterhin ist bei SCAMP1 eine deutliche, bei SCAMP2 und SCAMP3 eine moderate und bei SCAMP4 eine schwache Lokalisation im frühen Endosom beschrieben. Auch wurde gezeigt, dass SCAMP3 und SCAMP4 eine deutliche und SCAMP1 und SCAMP2 eine schwache Lokalisation im Trans-Golgi-Netzwerk zeigen. Demzufolge herrschte bisher die Meinung vor, dass SCAMP1 und SCAMP2 im endosomalen Recycling-Kompartiment und SCAMP3 und SCAMP4 im Trans-Golgi-Netzwerk exprimiert sind (Castle und Castle 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien zeigen, dass SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 in der Nähe des Zellkerns lokalisiert sind. Die Verwendung von zellkompartimentspezifischen Markern ermöglichte es, diese Region als Golgi-Apparat zu identifizieren. Des Weiteren konnte eine Kolokalisation der SCAMPs

untereinander im Golgi-Apparat und in zellulären Vesikeln nachgewiesen werden (Abb. 4.4.2-4.4.4). Laut der Studie von Castle und Castle (2005) könnten diese Vesikel zum endosomalen Recycling-Kompartiment gehören. Zusätzlich wurde beobachtet, dass SCAMP5 sich als einziges der drei SCAMPs stark in der Zellmembran befindet (Abb. 4.4.3). Ein weiterer Unterschied zwischen SCAMP5 und SCAMP1 oder SCAMP2 ist, dass SCAMP5 wesentlich häufiger lineare Strukturen (Tubuli) ausbildet als SCAMP1 und SCAMP2 (Abbildung 4.4.1). Diese linearen Strukturen unterliegen einem ständigen Auf- und Umbau. In Fall von SCAMP3 wurden bereits ähnliche lineare Strukturen beschrieben (Mota *et al.* 2009). Im Gegensatz zu SCAMP5 treten die SCAMP3-Strukturen nur dann auf, wenn die Zellen mit *Salmonella* infiziert sind. Weiterhin sind die Tubuli, die durch SCAMP3 und *Salmonella* entstehen dicker und einem weniger dynamischen Auf- und Abbau unterworfen. Unklar ist, ob die SCAMPs intrinsisch fähig sind, die Tubuli zu bilden oder ob diese sich an schon vorhandene lineare Strukturen der Zelle anlagern.

Die zwingende Notwendigkeit der zellulären Kolokalisation, welche einer Interaktion vorausgeht, besteht auch für die SCAMPs und TASK-1. Wird TASK-1 zusammen mit den SCAMPs koexprimiert, so zeigt sich für alle SCAMPs eine partielle Kolokalisation mit TASK-1 im endosomalen Vesikel, möglicherweise im endosomalen Recycling-Kompartiment (Castle und Castle 2005). In der Zellmembran ist TASK-1 ausschließlich mit SCAMP5 kolokalisiert. Dies war zu erwarten, da SCAMP1 und 2 in der Zellmembran nicht detektierbar sind (Abb. 4.4.6-4.4.8). Möglicherweise interagieren TASK-1 und SCAMP5 (statistisch) relativ häufig, da beide Proteine stark in der Membran vorkommen. Der Endozytoseprozess wird jedoch ausschließlich dann induziert, wenn SCAMP1 oder SCAMP2 an den bestehenden TASK-1-SCAMP5-Komplex binden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass SCAMP1 und 2 nur transient mit der Membran assoziiert und daher dort kaum nachweisbar sind.

### **Welche Domänen von TASK-1 sind an der Bindung von SCAMP5 beteiligt?**

Die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien (Renigunta *et al.* 2014, Lin *et al.* 2005) verdeutlichen, dass der C-Terminus von Ionenkanälen eine große Bedeutung für die Bindung an Interaktionspartner hat. Im Y2H-Assay hat sich



gezeigt, dass TASK-3 und SCAMP5 keine Interaktion aufweisen und SCAMP5 nicht den TASK-3-Strom beeinflusst (Abb. 4.1.1 und Abb. 4.2.2.1). Interessanterweise wurde auch in der Studie von Renigunta *et al.* (2014) berichtet, dass Syntaxin8 die Endozytose von TASK-3 nicht beeinflusst. Das deutet darauf hin, dass TASK-1 und TASK-3 auf unterschiedliche Weise endozytiert werden.

Wird nun der C-Terminus von TASK-1 auf TASK-3 übertragen (Renigunta *et al.* 2014), so können die SCAMPs den Strom dieser TASK-3/1-Chimäre reduzieren. Im Gegensatz dazu haben SCAMP1 und SCAMP5 keinen Einfluss auf die umgekehrte Chimäre, bei welcher der C-Terminus von TASK-3 auf TASK-1 (TASK-1/3) übertragen wurde (Abb. 4.2.3.1). Dies zeigt deutlich, dass der C-Terminus von TASK-1 notwendig für den Effekt der SCAMPs ist. Interessanterweise reduziert SCAMP2 leicht den Strom der TASK-1/3-Chimäre, es hat jedoch keinen Einfluss auf den TASK-3-Wildtyp (Abb. 4.2.2.1). Möglicherweise interagiert SCAMP2 mit Bereichen in TASK-1 unabhängig vom C-Terminus oder es handelt sich um ein chimären-spezifisches Artefakt.

Zur weiteren Eingrenzung der an der Interaktion mit den SCAMPs beteiligten Bereiche im C-Terminus von TASK-1 wurden verschiedene TASK-1 Konstrukte untersucht, bei denen Abschnitte des C-Terminus entweder mutiert oder deletiert wurden. Bei der Mutante TASK-1 Y300A wurde ein Endozytosesignal vom Yxx $\phi$  Typ mutiert (Renigunta *et al.* 2014). Dadurch sollte TASK-1 nicht mehr in der Lage sein, an AP2 zu binden und somit nicht mehr endozytiert werden. Jedoch hatte diese Mutation keinen Effekt auf die Endozytose durch die SCAMPs (Abb. 4.2.3.4). Das lässt darauf schließen, dass der stromreduzierende Effekt, der durch die SCAMPs verursacht wird, nicht wie bei Syntaxin8 über ein Endozytosemotiv vom Yxx $\phi$  Typ gesteuert wird (Renigunta *et al.* 2014). Die unterschiedliche Regulierung von TASK-1 und SCAMP-Proteinen durch Syntaxin8 könnte auf eine gewebsspezifische Regulation von TASK-1 hindeuten. Während Syntaxin8 ubiquitär exprimiert wird, wird SCAMP5 nur im Gehirn exprimiert. In vorangegangenen Studien wurde berichtet, dass SCAMP5 an neuronalen Erkrankungen beteiligt ist z.B. Autismus und Chorea Huntington (Castermans *et al.* 2010, Noh *et al.* 2009). Bei Patienten, die an Chorea Huntington erkrankt sind, wurde im Striatum eine ektopische

Expression von SCAMP5 nachgewiesen (Noh *et al.* 2009). Auf Grund der ektopischen Expression von SCAMP5 könnte auch die Interaktion mit TASK-1 beeinflusst werden. Es wäre also denkbar, dass TASK-1 ebenfalls an den neuronalen Erkrankungen beteiligt sein könnte. Eine weitere Studie von 2014 zeigte die bedeutende Rolle von SCAMPs in neuronalem Gewebe. In dieser Studie wurde bei einer *Drosophila* SCAMP Nullmutante, eine verringerte Lebensdauer und Verhaltensauffälligkeiten wie zum Beispiel eingeschränktes Klettern, Beeinträchtigung des Geruchssinns, verschlechtertes Langzeitgedächtnis und eine Anfälligkeit für hitzeinduzierte epileptische Anfälle aufgezeigt (Zheng *et al.* 2014). *Drosophila* ist zurzeit der einzige Modellorganismus, bei dem eine SCAMP Nullmutante existiert. Es wäre interessant zu erforschen, ob im Mausmodell der Phänotyp einer SCAMP Nullmutante ähnliche Merkmale ausbildet. Das Fehlen des SCAMP-Proteins beeinflusst die Regulation von TASK-1 im neuronalen Gewebe. Daher kann die Beteiligung von TASK-1 an den geschilderten Verhaltensmerkmalen nicht ausgeschlossen werden.

Eine weitere verwendete Mutante ist TASK-1- $\Delta$ i-20. Bei dieser fehlen C-terminal intern 20 Aminosäuren, für welche bereits beschrieben wurde, dass diese mit verschiedenen Proteinen wie p11 interagieren (Rajan *et al.* 2006, Renigunta *et al.* 2006, Zuzarte *et al.* 2009). Die SCAMPs reduzierten den Strom dieser Mutante jedoch ebenso stark, wie den des TASK-1-Wildtyps (Abb. 4.2.3.2). Die Interaktion der SCAMPs erfolgt also an einem anderen Bereich als dem für p11 (S100A10). Eine leichte Reduzierung des Effekts der SCAMPs konnte am ehesten bei der Mutante TASK-1- $\Delta$ -247-354, an der ein großer Teil des C-Terminus deletiert wurde, beobachtet werden (Abb. 4.2.3.3). Der C-Terminus von TASK-1 scheint daher trotz allem eine gewisse Rolle zu spielen. Interessanterweise konnte im GST-Pulldown keine Interaktion des isolierten C-Terminus von TASK-1 mit den SCAMPs gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass wahrscheinlich der C-Terminus von TASK-1 in seiner Gesamtheit und im Kontext der Tertiärstruktur des vollständigen Kanals an der Wirkung der SCAMPs auf den Kanal beteiligt ist.

### **Modell für die Endozytose von TASK-1**

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass drei Familienmitglieder der Secretory Carrier Membrane Proteins (SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5) als neue Interaktionspartner für TASK-1 identifiziert wurden. Wir konnten zeigen, dass TASK-1 mit Hilfe der SCAMPs endozytiert wird. Des Weiteren konnte im Proteininteraktionsassay gezeigt werden, dass die SCAMPs Homo- und Heterodimere bilden. Da aber nur SCAMP5 direkt an TASK-1 bindet, legen unsere Ergebnisse nahe, dass SCAMP5 als Adapterprotein zwischen TASK-1 und SCAMP1 oder SCAMP2 fungiert. Demzufolge bindet SCAMP1 oder SCAMP2 an den TASK-1–SCAMP5-Proteinkomplex. Über die NPF-repeats im N-Terminus von SCAMP1 oder SCAMP2 werden anschließend Proteine rekrutiert, welche eine EH-Domäne enthalten (EHDP), wie beispielsweise Intersektin 1,  $\gamma$ -Synergine oder Eps15. Die EHDP sind wiederum in der Lage, Adaptin 2 (AP2) zu binden, welches das Adapterprotein für Clathrin ist. Die Rekrutierung von Clathrin führt aufgrund der Polymerisierung der Clathrin-Triskelionen zur Ausbildung der Clathrin-Hülle des sich bildenden Vesikels (Clathrin-coated pits, CCP). Eps15 und Amphiphysin sind in der Lage, Dynamin zu rekrutieren. Dynamin bildet einen Ring um die Einstülpung des CCP, was sukzessive zur Abschnürung eines Clathrin-coated Vesikel (CCV) führt. Anschließend kann der endozytierte TASK-1-Kanal entweder abgebaut oder recycelt werden (Abb. 5.1).

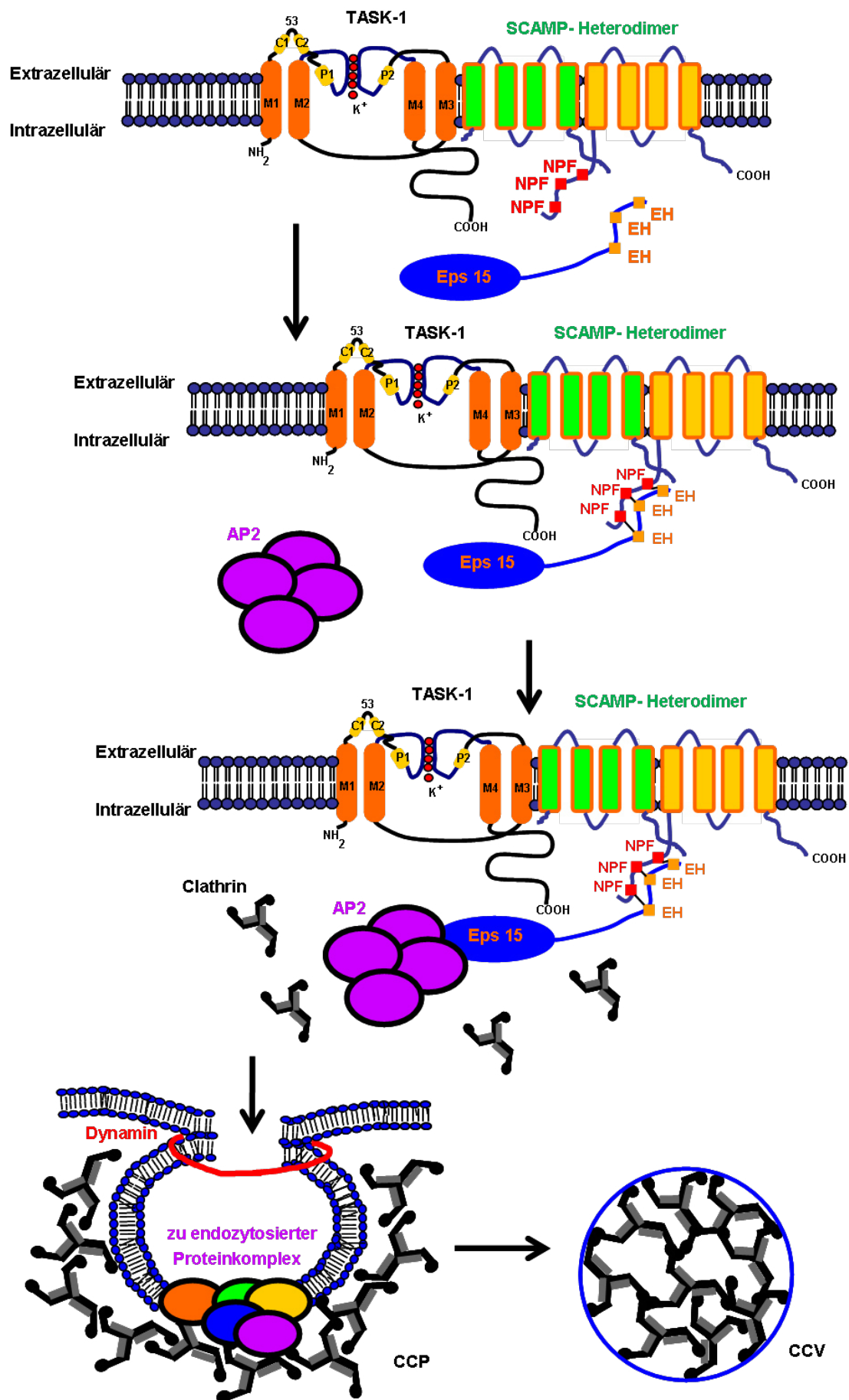


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Endozytose von TASK-1  
 Der SCAMP - Komplex besteht aus SCAMP5 und SCAMP1 oder SCAMP2. An diesen Komplex binden Eps15 (Proteine die eine Epsin Homologe Domäne enthalten). An die Eps15 bindet das AP 2, welches wiederum Clathrin bindet. Nach Bildung der CCP erfolgt mit Hilfe von Dynamin die Abschnürung von der Membran und es bilden sich die CCV.

## 6. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenzgen
AS	Aminosäure
A <sub>xxx</sub>	Absorption bei der Wellenlänge xxx in nm
bp	Basenpaar
c	Konzentration
d	Tag (Day)
bidest.	bidestilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N',N',N'</i> -tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FCS/FBS/FKS	Fötales geborenes Kälberserum (Fetal calvers/Bovine Serum)
g	Gramm
G – 418	Geneticin
GALT-DsRed	β-1,4-Galactosyltransferase-DsRed
h	Stunde (Hour)
HCl	Salzsäure
HOAc	Essigsäure
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenzgen
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat

$K_2HPO_4$	Dikaliumhydrogenphosphat
KOAc	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid
$\lambda$	Wellenlänge
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani Medium
$\mu A$	Stromstärke, Stromfluss
$\mu g$	Mikrogramm
$\mu l$	Mikroliter
$\mu M$	Mikromolar
mA	Milliampere
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MCS	Polylinkerregion (Multiple Cloning Site)
Milli-Q-Wasser	Hochreines Wasser, durch Millipore-Wasseraufbereitungsanlage gereinigt
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MUP	Methylumbelliferyl-Phosphat
NaCl	Natriumchlorid
$NaH_2PO_4$	Natriumdihydrogenphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	neugeborenes Kälberserum (Newborn Calfserum)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
$OD_{xxx}$	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx
nm	
P.	Präzipitation
$P_x$	Passage (x = Anzahl)
p.a.	Analysequalität (pro analysis)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

	(Phosphat Buffered Saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
Strom	Stromstärke
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen- Messungen (Two-Electrode-Voltage Clamp)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Üb.	Überstand
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
°C	Grad Celsius
%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2.1: Schematische Darstellung eines K <sub>2</sub> P Kanals .....	10
Abbildung 1.2.2: Phylogenetischer Stammbaum der 6 Unterfamilien der K <sub>2</sub> P-Kanäle .....	11
Abbildung 1.3.1: Die Sequenz der zwei Porenschleifen (P1 und P2) von TASK-1, TASK3 und TASK5 (Zhang <i>et al.</i> 2009). ....	13
Abbildung 1.4.1.1: Regulation von TASK-1 .....	14
Abbildung 1.5.1: Schematische Darstellung der Secretory carrier membrane proteine (SCAMP) ....	18
Abbildung 1.6.1: Schematische Darstellung der Kompartimente des sekretorischen, lysosomalen und endozytischen Systems.....	23
Abbildung 1.7.1.1 Schematische Darstellung von ENTH/ANTH Proteinen und ihren Bindemotiven.....	25
Abbildung 2.8.1: Darstellung des pBT3-N .....	35
Abbildung 2.8.2: Der Vektor enthält die Sequenzen des C-terminalen Anteil von Ubiquitin (Cub) und den des auxotrophen Marker Tryptophan ( <a href="http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/MOB/P01310DS.pdf">http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/MOB/P01310DS.pdf</a> ) .....	37

Abbildung 2.8.3: Plasmid pSGEM, Amp: Ampicillinresistenzgen, b: Replikationsursprung des Plasmids in Bakterien, c: Multicloningsite .....	38
Abbildung 3.4.2.1: Spannungsprotokoll zur Strommessung: Verlauf der Spannungsrampe .....	61
Abbildung 3.5.1: Schematische Darstellung des Oberflächenassays.....	62
Abbildung 3.8.1: Ablauf des Antikörper Aufnahme Assays. (V. Renigunta et.al., 2014) .....	65
Abbildung 4.1.1: Interaktion von SCAMP1, 2 und 5 mit den K <sub>2P</sub> -Kanälen TASK-1, -3 und -5.....	74
Abbildung 4.2.1.1: Titration des Effekts von SCAMPs auf den TASK-1-Strom	75
Abbildung 4.2.1.2: RT-PCR von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	76
Abbildung 4.2.1.3: Oberflächenexpression von TASK-1 .....	77
Abbildung 4.2.1.4: Schematische Darstellung der SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 Proteine und deren jeweiligen Mutationen.....	78
Abbildung 4.2.1.5: Analyse der Wirkung von SCAMP-Mutanten auf den TASK-1-Strom .....	79
Abbildung 4.2.1.6: Injektion von TASK-1 und SCAMP-Δ NPF .....	80
Abbildung 4.2.1.7: Einfluss von SCAMP-Δ NPF auf die Oberflächenexpression von TASK-1 .....	80
Abbildung 4.2.1.8: Effekt von Nystatin auf den TASK-1-induzierten Strom .....	81
Abbildung 4.2.1.9: Relativer TASK-1 Strom in Abhängigkeit von Dynasore.....	82
Abbildung 4.2.1.10: Einfluss von AP180 C auf den TASK-1 Strom.....	83
Abbildung 4.2.1.11 Schematische Darstellung der Sandwich-Hypothese von TASK-1 und den SCAMPs .....	83
Abbildung 4.2.1.12: Relativer TASK-1 Strom unter dem Einfluss der SCAMPΔNPF -Mutanten .....	84
Abbildung 4.2.1.13: Schematische Darstellung von SCAMP5 mit den jeweils eingefügten Mutationen .....	85
Abbildung 4.2.1.14: Relativer TASK-1 Strom in Abhängigkeit von SCAMP5-Mutanten .....	86
Abbildung 4.2.2.1: Effekt der SCAMPs auf den TASK-3-induzierten Strom .....	87
Abbildung 4.2.2.2: Effekt der SCAMPs auf den TREK1a-induzierten Strom .....	88
Abbildung 4.2.2.3: Relativer Kir2.1 Strom in Abhängigkeit von SCAMPs.....	88
Abbildung 4.2.3.1: Einfluss der SCAMPs auf den Strom von TASK-1/TASK-3-Chimären.....	89
Abbildung 4.2.3.2: Einfluss der SCAMPs auf den Strom von TASK-1Δi20.....	90
Abbildung 4.2.3.3: Relativer TASK-1Δ247-354Strom in Abhängigkeit von SCAMPs.....	90
Abbildung 4.2.3.4: Relativer TASK-1 Y300A Strom in Abhängigkeit von SCAMPs.....	91
Abbildung 4.3.1.1: GST-Pull Down .....	93
Abbildung 4.3.2.1: HIS-Pull Down .....	96
Abbildung 4.3.2.3: SCAMP5 Δ N-Term HIS-Pull Down mit SCAMP1, SCAMP2, SCAMP5-myc.....	97
Abbildung 4.4.1: Zelluläre Lokalisation der SCAMP-Proteine .....	99
Abbildung 4.4.2: Lokalisation von SCAMP1 und SCAMP2 zusammen mit Markern für den Golgi-Apparat und die Zellmembran .....	101
Abbildung 4.4.3: Kolokalisation von SCAMP5 zusammen mit Markern für den Golgi-Apparat und die Zellmembran.....	102
Abbildung 4.4.4: Kolokalisation von SCAMP1 und SCAMP2 mit SCAMP5....	103



Abbildung 4.4.5: Lokalisation von verschiedenen TASK-1-Konstrukten in HeLa-Zellen .....	105
Abbildung 4.4.6: Kolokalisation von SCAMP1 mit TASK-1 in HeLa-Zellen ....	106
Abbildung 4.4.7: Kolokalisation von SCAMP2 mit TASK-1 in HeLa-Zellen ....	107
Abbildung 4.4.8: Kolokalisation von SCAMP5 mit TASK-1 in HeLa-Zellen ....	109
Abbildung 4.5.1: RT-PCR von Cos7 – Zellen .....	110
Abbildung 4.5.2: Expression von endogenem SCAMP1, SCAMP2 und SCAMP5 in Cos7 Zellen .....	111
Abbildung 4.5.3: Internalisierung von TASK-1-HA in Abhängigkeit von SCAMPs .....	112
Abbildung 4.5.4: Relative Oberflächenexpression von TASK-1 .....	113
Abbildung 4.5.5: Relative endozytierte TASK-1-Kanäle .....	114
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Endozytose von TASK-1 .....	128

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Interaktionspartner der K <sub>2</sub> P-Kanäle .....	12
Tabelle 2: Einfluss von TASK- Kanälen bei pathophysiologischen Befunden ..	13
Tabelle 3: Endozytose Motive und ihre Bindungsstellen an den dazugehörigen Adapterproteinen .....	24
Tabelle 4: Standard PCR- Ansatz .....	54
Tabelle 5: Standard PCR-Programm für Dynazym- Polymerase .....	55
Tabelle 6: Standard PCR- Programm für Pfu- Polymerase .....	55
Tabelle 7: RT-PCR-und PCR Ansatz .....	55
Tabelle 8: RT- PCR-Programm .....	56
Tabelle 9: Standard Ligationsansatz .....	57
Tabelle 10: Protokoll zur Herstellung von cRNS .....	58
Tabelle 11: Angaben zur optimalen Auftrennung von Proteinen in Bezug auf die Acrylamidkonzentration .....	69
Tabelle 12: Zusammensetzung des 12%Trenngels .....	70
Tabelle 13: Zusammensetzung des 4%Samelgels .....	70
Tabelle 14: Folgende Programme wurden zur Auswertung von Sequenzen benutzt .....	72

## Referenzen

Aeyung K., Tae-Hwan S., Seung-Min S., Chuong D. P., Dong-Ki C., Myung-Hee K., Yong-Sung K. (2012)

Cellular Internalization Mechanism and Intracellular Trafficking of Filamentous M13 Phages Displaying a Cell-Penetrating Transbody and TAT Peptide. *journal.pone.005181*

Alberts B., Schäfer U., Johnson A. und Lewis J. (2004)

Molekularbiologie der Zelle Auflage 4 ISBN 3-527-30492-4 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA Weinheim; Seite 827-839,844-860,879-882

Anantharam A., Lewis A., Panaghie G., Gordon E., McCrossan Z., Lerner D., Abbott GW. (2003)

RNA interference reveals that endogenous Xenopus MinK-related peptides govern mammalian K<sup>+</sup> channel function in oocyte expression studies. *J Biol Chem.* 278:11739-45.

Bandulik S., Penton D., Barhanin J., Warth R. (2010)

TASK-1 and TASK3 potassium channels: determinants of aldosterone secretion and adrenocortical zonation. *Horm Metab Res.* 450-7.

Benjamin S., Weidberg H., Rapaport D., Pekar O., Nudelman M., Segal D., Hirschberg K., Katzav S., Ehrlich M., Horowitz M. (2011)

EHD2 mediates trafficking from the plasma membrane by modulating Rac1 activity. *Biochem J.* 439:433-42.

Berg A., Talley E., Manger J., Bayliss D. (2004)

Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci.* 28;24:6693-702.

Bittner S., Budde T., Wiendl H., Meuth SG. (2010)

From the Background to the Spotlight: TASK Channels in Pathological Conditions. *Brain Pathol.* 20:999-1009

Bittner S., Meuth SG., Göbel K., Melzer N., Herrmann AM., Simon OJ., Weishaupt A, Budde T., Bayliss D., Bendszus M., Wiendl H. (2009)

TASK-1 modulates inflammation and neurodegeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Brain.* 32:2501-16

- Brand H. S., Castle D. J., (1993)  
SCAMP 37, a new marker within the general cell surface recycling system. *EMBO J.* 12(10):3753-61
- Buttigieg J., Pan J., Yeger H., Cutz E. (2002)  
NOX2 (gp91phox) is a predominant O<sub>2</sub> sensor in a human airway chemoreceptor cell line: biochemical, molecular, and electrophysiological evidence. *J. Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 303:L598-607
- Bonifacino J., Glick B. (2004)  
The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 2004 116:153-66
- Cai Y., Jia T., Lam SK., Ding Y., Gao C., San MW., Pimpl P., Jiang L. (2011)  
Multiple cytosolic and transmembrane determinants are required for the trafficking of SCAMP1 via an ER-Golgi-TGN-PM pathway. *Plant J.* 65:882-96
- Caplan S., Naslavsky N., Hartnell L., Lodge R., Polishchuk R., Donaldson J., Bonifacino J. (2002)  
A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *EMBO* 21:2557-67
- Castle A., Castle D. (2005)  
Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface. *J Cell Sci* 118:3769-80
- Castermans D., Volders K., Crepel A., Backx L., De Vos R., Freson K., Meulemans S., Vermeesch J., Schrandt-Stumpel C., De Rijk P., Del-Favero J., Van Geet C., Van De Ven W., Steyaert J., Devriendt K., Creemers J. (2010)  
SCAMP5, NBEA and AMISYN: three candidate genes for autism involved in secretion of large dense-core vesicles. *Hum Mol Genet.* 19:1368-78
- Chen H., Slepnev I. V., Di Fiore P. P., and De Camilli P. (1999)  
The Interaction of Epsin and Eps15 with the Clathrin Adaptor AP-2 Is Inhibited by Mitotic Phosphorylation and Enhanced by Stimulation-dependent Dephosphorylation in Nerve Terminals. *J Biol Chem* 274, 3257-3260

- Chi S., Cao H., Chen J., McNiven M. (2008)  
Eps15 Mediates Vesicle Trafficking from the trans-Golgi Network via an Interaction with the Clathrin Adaptor AP-1. *Mol Biol Cell.* 19:3564-75
- Daboussi L., Giancarlo Co., Gregory S. P. (2012)  
Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nature Cell Biology* 14, 239–248
- Diering G. H., Church J. and Numata M. (2009)  
Secretory Carrier Membrane Protein 2 Regulates Cell-surface Targeting of Brain-enriched Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE5. *J Biol Chem.* 284, 13892-13903
- Duprat F., Lesage F., Fink M., Reyes R., Heurteaux C. and Lazdunski M. (1997)  
TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16: 5464–5471
- Enyedi P., Czirják G. (2010)  
Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* 90:559-605
- Fang L., Garuti R., Kim B., Wade J., Welling P. (2009)  
The ARH adaptor protein regulates endocytosis of the ROMK potassium secretory channel in mouse kidney. *J Clin Invest.* 119:3278-89
- Feliciangeli S., Tardy MP., Sandoz G., Chatelain FC., Warth R., Barhanin J., Bendahhou S., Lesage F. (2010)  
Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. *J Biol Chem.* 285:4798-805.
- Ferl R., Manak M., Reyes M. (2002).  
The 14-3-3s. *Genome Biol.* 3:REVIEWS3010
- Fernández-Chacón R., Achiriloaie M., Janz R., Albanesi J., Südhof T. (2000)  
SCAMP1 Function in Endocytosis. *J Biol Chem.* 275:12752-6
- Fernández-Chacón R., Südhof TC. (2000)  
Novel SCAMPs lacking NPF repeats: ubiquitous and synaptic vesicle-specific forms implicate SCAMPs in multiple membrane-trafficking functions. *J Neurosci.* 20:7941-50

- Fjorback A., Müller H., Haase J., Raarup M., Wiborg O. (2011)  
Modulation of the dopamine transporter by interaction with Secretory Carrier Membrane Protein 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 406:165-70
- Flynt A., Lai E. (2011)  
RNAi in *Xenopus*: look before you leap. *Genes Dev.* 1105-8.
- Ford M. G. J., Pearse B. M. F., Higgins M. K., Vallis Y., Owen D. J., Gibson A., Hopkins C. R., Evans P. R., McMahon H. T. (2001)  
Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* ;291(5506):1051-5
- Gabriel L., Lvov A., Orthodoxou D., Rittenhouse A., Kobertz W., Melikian H. (2012)  
The acid-sensitive, anesthetic-activated potassium leak channel, KCNK3, is regulated by 14-3-3 $\beta$ -dependent, protein kinase C (PKC)-mediated endocytic trafficking. *J Biol Chem.* 287:32354-66
- Gao Y., Bertuccio C., Balut C., Watkins S., Devor D. (2012)  
Dynamin- and Rab5-Dependent Endocytosis of a Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel, KCa2.3. *PLoS One.* 7:e44150.
- Girard C., Tinel N., Terrenoire C., Romey G., Lanzański M., Borsotto M. (2002)  
p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K<sup>+</sup> channel, TASK-1. *EMBO J* 2;21(17):4439-48
- Gold M. (Diplomarbeit 2009)  
Die Charakterisierung der Interaktion von TASK-1 mit Proteinen der SCAMP-Familie. Seite 33
- Greene L. and Tischler A. (1976)  
Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73: 2424–2428.
- Guilherme A., Soriano N., Bose S., Holik J., Bose A., Pomerleau D., Furcinitti P., Leszyk J., Corvera S., Czech M. (2004)  
EHD2 and the novel EH domain binding protein EHBP1 couple endocytosis to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 279:10593-605

- Han C., Chen T., Yang M., Li N., Liu H., Cao X. (2009)  
Human SCAMP5, a novel secretory carrier membrane protein, facilitates calcium-triggered cytokine secretion by interaction with SNARE machinery. *J Immunol.* 182:2986-96
- Heinrich J. M., Qiao H., Shields A., Wright J., Moore J. L., Winder D., Galli A. and Blakely R. (2009)  
Subcellular localization of the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter. *BMC Neuroscience* 10:65
- Heitzmann D., Warth R. (2007)  
Physiology and Pathophysiology of Potassium Channels in Gastrointestinal Epithelia. *Physiol Rev.* 88:1119-82
- Hirst J., Borner H.H. G., Harbour M., and Robinson S. M. (2005).  
The Aftiphilin/p200/γ-Synergin Complex. *Mol. Biol. Cell* 16:5 2554-2565
- Honoré E. (2007).  
The neuronal background K<sub>2P</sub> channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci.* 8:251-61.
- Hsu K., Seharaseyon J., Dong P., Bour S, Marbán E. (2004)  
Mutual Functional Destruction of HIV-1 Vpu and Host TASK-1 Channel. *Mol Cell.*14:259-67
- Hunter M. P., Russo A., and O'Bryan J.P. (2013)  
Endocytic adaptor protein intersectin 1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons. *Int J Mol Sci.* 14: 7829–7852
- Hyman J., Chen H., Di Fiore P.P., De Camilli P., and Brunger T. A. (2000).  
Epsin 1 Undergoes Nucleocytosolic Shuttling and Its Eps15 Interactor Nh<sub>2</sub>-Terminal Homology (Enth) Domain, Structurally Similar to *Armadillo* and Heat Repeats, Interacts with the Transcription Factor Promyelocytic Leukemia Zn<sup>2+</sup> Finger Protein (Plzf). *J Cell Biol.* 149: 537–546.
- Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2007)  
Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* 371, 21-31.

Kieken F., Sharma M., Jovic M., Giridharan S., Naslavsky N., Caplan S., Sorgen P. (2010)

Mechanism for the selective interaction of C-terminal Eps15 homology domain proteins with specific Asn-Pro-Phe-containing partners. *J Biol Chem.*285:8687-94

Kilisch M. & Lytovchenko O., Schwappach B.& Renigunta V.& Daut J. (2015)

The role of protein–protein interactions in the intracellular traffic of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *Eur J Physiol* 00424-014-1672-2

Kim Y., Bang H., Kim D. (2007)

Secretory Carrier Membrane Protein SCAMP2 and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Interactions in the Regulation of Dense Core Vesicle Exocytosis. *J Biol Chem.* 275:9340-7.

Krebs C., Pfaff D. (2001)

Expression of the SCAMP-4 gene, a new member of the secretory carrier membrane protein family, is repressed by progesterone in brain regions associated with female sexual behavior. *Brain Res Mol Brain* 88:144-54.

Legendre-Guillemain V., Wasiak S., Hussain N., Angers A., McPherson P. (2004) ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J Cell Sci.* 117:9-18

Liao H., Ellena J., Liu L., Szabo G., Cafiso D., Castle D. (2007)

Secretory carrier membrane protein SCAMP2 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions in the regulation of dense core vesicle exocytosis. *Biochemistry* 25;46(38):10909-20.

Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G. (1976)

A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17:62-70

Lijiang M., M.D., Ph.D., Danilo Roman-Campos, Ph.D., Eric D. Austin, M.D., Mélanie Eyries, Ph.D., Kevin S. Sampson, Ph.D., Florent Soubrier, M.D., Ph.D., Marine Germain, M.Sc., David-Alexandre Trégouët, Ph.D., Alain Borczuk, M.D., Erika Berman Rosenzweig, M.D., Barbara Girerd, Ph.D., David Montani, M.D., Ph.D., Marc Humbert, M.D., Ph.D., James E. Loyd, M.D., Robert S. Kass, Ph.D., and Wendy K. Chung, M.D., Ph.D. (2013)

A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 369:351-361

Lin P. J. C., Williams W. P., Luu Y., Molday R. S., Orlowski J. and M. Numata (2005)

Secretory carrier membrane proteins interact and regulate trafficking of the organellar (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger NHE7. *J Cell Sci* 118, 1885-1897

Liu L., Guo Z., Tieu Q., Castle A., Castle D. (2002)

Role of Secretory Carrier Membrane Protein SCAMP2 in Granule Exocytosis. *Mol Biol Cell*. 13:4266-78

Madden D., Swiatecka-Urban A. (2012)

Tissue-specific control of CFTR endocytosis by Dab2. *Commun Integr Biol* 5:473-6

Mant A., Williams S., O'Kelly I. (2013)

Acid sensitive background potassium channels K<sub>2P</sub>3.1 and K<sub>2P</sub>9.1 undergo rapid dynamin-dependent endocytosis. *Channels (Austin)* 7:288-302

Mathie A., Rees K., El Hachmane M., Veale E. (2010)

Trafficking of neuronal two pore domain potassium channels. *Curr Neuropharmacol*. 276-86.

Mota L. J., Ramsden A. E., Liu M., Castle J. D. and Holden D. W. (2009)

SCAMP3 is a component of the Salmonella-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-Golgi trafficking. *Cell Microbiol* 11: 1236-53

Müller H., Wiborg O., Haase J. (2006)

Subcellular Redistribution of the Serotonin Transporter by Secretory Carrier Membrane Protein 2. *J Biol Chem* 281:28901-9



- Nogueira E., Gerry D., Mantero F., Mariniello B., Rainey W. (2009)  
The role of TASK-1 in aldosterone production and its expression in normal adrenal and aldosterone-producing adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 73:22-9
- Noh J., Lee H., Song S., Kim N., Im W., Kim M., Seo H., Chung C., Chang J., Ferrante R., Yoo Y., Ryu H., Jung Y. (2009)  
SCAMP5 links endoplasmic reticulum stress to the accumulation of expanded polyglutamine protein aggregates via endocytosis inhibition. *J Biol Chem* 284:11318-25
- O'Kelly I., (2014)  
Endocytosis as a mode to regulate functional expression of two-pore domain potassium (K<sub>2P</sub>) channels. *Eur J Physiol* 467:1133–1142
- O'Kelly I., Butler M., Zilberberg N., Goldstein S. (2002)  
Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111:577-88
- Okur M., Ooi J., Fong C., Martinez N., Garcia-Dominguez C., Rojas J., Guy G., O'Bryan J. (2011)  
Intersectin 1 enhances Cbl ubiquitylation of epidermal growth factor receptor through regulation of Sprouty2-Cbl interaction. *Mol Cell Biol* 32:817-25
- Page L. J., Sowerby P. J., Lui W., and Robinson M. S. (1999)  
g-Synergisin: An EH Domain-containing Protein that Interacts with g-Adaptin. *J Cell Biol* 146: 993–1004
- Prosser D., Wendland B. (2012)  
Conserved roles for yeast Rho1 and mammalian RhoA GTPases in clathrin-independent endocytosis. *Small GTPases* 3:229-3
- Rajan S., Preisig-Müller R., Wischmeyer E., Nehring R., Hanley P., Renigunta V., Musset B., Schlichthörl G., Derst C., Karschin A., Daut J. (2002)  
Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiol* 545.1, pp. 13–26
- Ramanan V., Agrawal N. J., Liu J., Engles S., Toy R., and Radhakrishnan R. (2011)  
Systems biology and physical biology of clathrin-mediated endocytosis. *Integr Biol (Camb)* 3: 803–815.

Renigunta V., Fischer T., Zuzarte M., Kling S., Zou X., Siebert K., Limberg M. M., Rinné S., Decher N., Schlichthörl G., and Daut J. (2014)

Cooperative endocytosis of the endosomal SNARE protein syntaxin-8 and the potassium channel TASK-1. *Mol Biol Cell* E13-10-0592

Renigunta V., Yuan H., Zuzarte M., Rinné S., Koch A., Wischmeyer E., Schlichthörl G., Gao Y., Karschin A., Jacob R., Schwappach B., Daut J., Preisig-Müller R. (2006).

The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1. *Traffic* 7:168-81

Renigunta V., Zou X., Kling S., Schlichthörl G., Daut J. (2014)

Breaking the silence: functional expression of the two-pore-domain potassium channel THIK-2. *Pflugers Arch.* 466(9):1735-45

Mishra S. K., Funair L., Cressley A., Gittes G. K., Burns R. C. (2012)

High-Affinity Dkk1 Receptor Kremen1 Is Internalized by Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLoS ONE*; Vol. 7 Issue 12, p1

Musset B., Schlichthörl G., Derst C., Karschin A., Daut J. (2002)

Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol* 545:13-26

Shieh C., Coghlan M., Sullivan J., Gopalakrishnan M. (2000)

Potassium Channels Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol Rev* 52:557-94

Thiele C., Gerdes H., Huttner W. (1997)

Protein secretion: puzzling receptors. *Curr Biol* 7:R496-R500

Toyoda H., Saito M., Okazawa M., Hirao K., Sato H., Abe H., Takada K., Funabiki K., Takada M., Kaneko T., Kang Y. (2010)

Protein Kinase G Dynamically Modulates TASK-1-Mediated Leak K Currents in Cholinergic Neurons of the Basal Forebrain. *JNEUROSCI* 5407-09

Weng Z., Rickles R., Feng S., Richard S., Shaw A., Schreiber S., Brugge J. (1995)

Structure-function analysis of SH3 domains: SH3 binding specificity altered by single amino acid substitutions. *Mol Cell Biol* 15:5627-34

Wu T., Castle J. (1997)

Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs). *J Cell Sci* 110:1533-41

Yang S., Lee K., Lee J., Lee J., Lee K., Rhee J. (2013)

Inhibition of SCAMP1 suppresses cell migration and invasion in human pancreatic and gallbladder cancer cells. *Tumour Biol* 34:2731-9

Zaarour N., Defontaine N., Demaretz S., Azroyan A., Cheval L., Laghmani K. (2010)

Secretory Carrier Membrane Protein 2 Regulates Exocytic Insertion of NKCC2 into the Cell Membrane. *J Biol Chem.* 18;286:9489-502

Zhang H., Parker J., Shepherd N., Creazzo T. (2009)

Developmental expression of a functional TASK-1 2P domain K<sup>+</sup> channel in embryonic chick heart. *J Biomed Sci.* 1423-0127-16-104

Zheng J., Tham C., Keatings K., Fan S., Liou A., Numata Y., Allan D., Numata M. (2014)

Secretory Carrier Membrane Protein (SCAMP) deficiency influences behavior of adult flies. *Front Cell Dev Biol.* 18;2:64

Zuzarte M., Heusser K., Renigunta V., Schlichthörl G., Rinné S., Wischmeyer E., Daut J., Schwappach B., Preisig-Müller R. (2009)

Intracellular traffic of the K<sup>+</sup> channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J Physiol* 929-52

## Webseiten

<http://www.abcam.com/a549-human-lung-adenocarcinoma-epithelial-cell-line-whole-cell-lysate-ab7910.html>  
<http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/PAGE.pdf>  
[http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e1883/e2047/e1953/index\\_ger.html](http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e1883/e2047/e1953/index_ger.html)  
[http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e162/e1158/index\\_ger.html](http://www.cell-lines-service.de/content/e174/e162/e1158/index_ger.html)  
[http://www.clontech.com/DE/Products/Fluorescent\\_Proteins\\_and\\_Reporters/Fluorescent\\_Proteins\\_by\\_Name/DsRed-Monomer\\_Fluorescent\\_Protein?sitex=10024:22372:US](http://www.clontech.com/DE/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Fluorescent_Proteins_by_Name/DsRed-Monomer_Fluorescent_Protein?sitex=10024:22372:US)  
[http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent\\_Proteins\\_and\\_Reporters/Fluorescent\\_Proteins\\_by\\_Name/mCherry\\_Fluorescent\\_Protein](http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Fluorescent_Proteins_by_Name/mCherry_Fluorescent_Protein)  
<http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/MOB/P01310DS.pdf>  
<http://t1domain.neusc.bcm.tmc.edu/basevectorseqs/pegfp-c1mapmcs.pdf>  
<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/de/GELifeSciences/28954549>  
[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pbudce4\\_1man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pbudce4_1man.pdf)  
<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcDNS3.1-.pdf>  
[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcDNS3.1v5histopo\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcDNS3.1v5histopo_map.pdf)  
[http://www.mobitec.de/de/products/bio/01\\_2H\\_sys/index.php?y2h.html](http://www.mobitec.de/de/products/bio/01_2H_sys/index.php?y2h.html)  
<http://www.molekuelkueche.de/DE/methods/DNSConcentration.html>  
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UMZ2>  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001178111.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001178111.1)  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000198794;r=15:74995598-75021495;t=ENST00000361900](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000198794;r=15:74995598-75021495;t=ENST00000361900)

Webseiten wurden zuletzt am 15. 09.2014 besucht.

## **Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Technischen Universität Darmstadt waren:

Prof. Dencher, Dr. Engelkamp, Prof. Engstler, Dr. Fischer – Schliebs,  
Prof. Friedl, Prof. Galuske, Prof. Giersch, Prof. Göringer, Prof. Hamacher, Prof.  
Heider, OStr.i. Hesch, Prof. Holstein, PD. Dr. U. Homann, Dr. M. Homann,  
Prof. Huber, Prof. Kaldenhoff, PD. Dr. Kletzin, OStr.i. Klose, Prof. Kolmar, Prof.  
Kraft, Prof. Langner, Prof. Layer, Prof. Lindner, Dr. Ing. Minol, Prof. Neumann,  
Prof. Pfeifer, Dr. Rößler, Prof. Schneider, Dr. Schuster, Dr. Sperling, Prof.  
Scheu, Prof. Schwabe-Kratochwil, Prof. Thiel, Priv. Doz. Dr. Wollny

Meine akademischen Lehrer an der Universität Marburg waren:

Prof. Daut, Dr. Renigunta

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Jürgen Daut dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion an der Philipps- Universität Marburg durchzuführen.

Ich danke Herrn Dr. Vijay Renigunta für die gute Betreuung, motivierende Hilfestellung und stetige Unterstützung während meiner Promotion.

Ich danke auch meinen Arbeitskollegen für die gute Zusammenarbeit im Labor und meinen Freunden.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Denise, meiner Schwester Susann und meinen Eltern Antje und Jürgen Kling, die mich in jeder Lebenslage immer unterstützt haben und es mir ermöglicht haben, meinen Weg zu gehen.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Stefan Kling, geboren am 12.06.1981 in Hildburghausen, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Die Rolle von SCAMP Proteinen beim intrazellulären Transport des Kaliumkanals TASK-1“

im Institut für Physiologie und Pathophysiologie unter Leitung von Prof. Daut und mit Unterstützung von Dr. Renigunta ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in-oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch zur Zulassung zur Promotion, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Datum:

Unterschrift: